

Российская академия наук

**РОССИЙСКИЙ  
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ  
ЖУРНАЛ**

**Russian Journal of Immunology**

**Том 13 (22), №3**

**2019**

**Июль – Сентябрь**

Журнал основан в 1996 г.  
Выходит 4 раза в год  
ISSN 1028-7221

*Журнал издается под руководством отделения биологических наук РАН  
при участии Российского научного общества иммунологов*

*Главный редактор*  
В.А. Черешнев

*Редакционная коллегия:*

В.А. Козлов (*зам. главного редактора*),  
И.Г. Козлов (*зам. главного редактора*), А.П. Ризопулу (*отв. секретарь*), Г.А. Бочаров,  
Ф.Ю. Гариб, З.Г. Кадагидзе, Э.В. Карамов (*зам. главного редактора*),  
А.В. Караулов, Е.А. Корнева, С.А. Недоспасов,  
И.В. Нестерова, Р.В. Петров, А.В. Полевщиков, А.П. Продеус, Р.И. Сепиашвили,  
А.С. Симбирцев, Н.Ю. Сотникова, А.А. Тотолян, Т.Г. Федоскова, И.С. Фрейдлин, Р.М. Хаитов,  
С.Б. Чекнёв, М.В. Черешнева

*Редакционный совет:*

А.Я. Арион, И.П. Балмасова, А.Н. Глушков, И.С. Гуцин, М.В. Дегтярева,  
Н.А. Зорин, И.П. Корюкина, Г.А. Невинский, М.Б. Раев, А.Г. Румянцев,  
Л.П. Сизякина, И.А. Тузанкина, В.С. Ширинский, К.В. Шмагель

*Международный редакционный совет (по согласованию)*

И. Беляков (США), Г.Н. Дранник (Украина), Д.К. Новиков (Белоруссия),  
А. Полторак (США), А. Руденский (США), М.С. Vene (Франция),  
J.L. Fahey (США), М. Sela (Израиль), Н. Stockinger (Австрия)

**Адрес редакции:** 119991 ГСП-1 Москва В-334 Ленинский проспект, 32а, каб. 423

Тел.: 8-903-567-0714, Факс: (495) 434-6212

E-mail: ruimm@yandex.ru

Сайт: [www.immunoforum.ru](http://www.immunoforum.ru)

**Журнал включен в перечень изданий, рекомендованных ВАК  
для публикации научных результатов диссертации на соискание  
ученой степени кандидата и доктора наук**

**Журнал цитируется в Chemical Abstracts, Index Medicus/Medline/PubMed**

**Москва**

---

© Российская академия наук, 2019

© Составление. Редакция

«Российский иммунологический журнал», 2019

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 13 (22), № 3, 2019

## Оригинальные статьи

- К. С. Абрамов, Е. В. Давыдова, М. В. Осиков*  
Сравнительная оценка показателей апоптоза и пролиферации при изолированном переломе бедренной кости в условиях системной озонотерапии 1085
- И. Н. Аликина*  
Оценка состояния системы клеточного иммунитета у работников предприятия по подземной добыче хромовой руды 1089
- А. В. Виноградов, А. В. Резайкин, Е. А. Партылова, С. В. Сазонов, А. Г. Сергеев*  
Опыт иммунологической диагностики и лечения острого миелобластного лейкоза, резистентного к программной полихимиотерапии, у больного молодого возраста 1093
- Э. Ф. Галимова, О. Ю. Травников, З. Г. Хайбуллина, А. З. Муртазина, Т. С. Асадуллина, Ш. Н. Галимов*  
Содержание цитокинов в сперме при бесплодии, ассоциированном с хроническим простатитом 1099
- И. Ф. Гетте, В. В. Емельянов, А. В. Белоусова, И. Г. Данилова, Л. П. Сидорова, Т. А. Цейтлер*  
Влияние соединения из ряда замещенных 1,3,4-6Н-тиадиазинов на содержание цитокинов в плазме крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа 1103
- О. А. Гизингер, О. Р. Зиганшин, А. О. Лакницкая*  
Бактерицидные эффекты монохроматического света 635 нм и 450 нм, в отношении *Staphylococcus aureus* у пациентов со стафилодермиями 1108
- О. А. Гизингер, Н. В. Корнова, К. С. Зырянова, Р. А. Иванова, В. Е. Назарова*  
Эффективность комплексной терапии хронического аденоидита с использованием монохроматического когерентного излучения с длиной волны 635 нм 1113
- И. А. Гольдина, Е. В. Маркова, И. А. Орловская, Л. Б. Топоркова*  
Иммунопозмодулирующие свойства оригинального комплекса биофлавоноидов «Эпигенорм антивир» 1118
- О. В. Долгих, О. А. Казакова, А. В. Кривцов*  
Оценка экспрессии CD127<sup>-</sup> и CD95<sup>+</sup> и генетического профиля женщин репродуктивного возраста, экспонированных фенолом 1125
- О. В. Долгих, А. А. Мазунина, А. В. Кривцов, М. А. Гусельников*  
Иммунобиохимические показатели и сравнительная оценка полиморфизма генов детского населения юга Сибири 1129
- В. В. Емельянов, И. Г. Данилова, С. А. Бриллиант, И. Ф. Гетте, Л. П. Сидорова, Т. А. Цейтлер, Ю. Н. Ключева*  
Сравнительная характеристика влияния замещенных 1,3,4-6Н-тиадиазинов на показатели периферической крови крыс с аллоксановым сахарным диабетом 1134
- Е. Н. Ермолаева, С. Л. Сашенков, С. А. Кантюков, В. И. Петухова, В. П. Яковлева*  
Влияние церулоплазмينا на продукцию цитокинов при хронических физических нагрузках субмаксимальной мощности 1140
- Н. А. Забокряцкий*  
Экспериментальное обоснование разработки и конструирования нового биогепатопротектора 1145
- Н. А. Забокряцкий*  
Иммунобиологические аспекты применения нового метабиотика 1150

С. А. Заморина, Л. С. Литвинова, Н. М. Тодосенко, В. П. Тимганова, М. С. Бочкова, К. Ю. Шардина, П. В. Храмцов, М. Б. Раев, В. А. Черешнев	
Влияние альфа-фетопротеина на цитокиновый профиль активированных Т-хелперов	1157
А. В. Зурочка, В. А. Зурочка, Л. О. Фомина, А. И. Файзуллина, М. А. Добрынина, В. А. Гриценко	
Оценка цитокиноподобной активности <i>Staphylococcus aureus</i> в зависимости от наличия генетических детерминант стафилококкового белка А	1163
А. В. Зурочка, В. А. Зурочка, Л. О. Фомина, А. И. Файзуллина, М. А. Добрынина, В. А. Гриценко	
Детекция цитокиноподобных веществ с помощью тест-системы для определения цитокинов мышей у <i>Staphylococcus aureus</i> , оппозитных по гену <i>SPA</i>	1168
Е. Н. Исаева, С. А. Синева, Н. В. Пигарева, А. С. Симбирцев	
Получение моноклональных антител к PD-1 человека и определение их специфической активности методом проточной цитометрии	1173
А. С. Карцева, М. В. Силкина, О. В. Калмантаева, Р. И. Миронова, В. В. Фирстова, В. М. Павлов, И. Г. Шемякин	
Сравнение раннего иммунного ответа мышей, иммунизированных туляремийным вакцинным штаммом и его производными	1177
И. В. Кудрявцев, А. Г. Ильвес, А. В. Ильченко, И. И. Кробинец, О. М. Новоселова, К. С. Рубаник, М. К. Серебрякова, Л. Н. Прахова	
Изменения в субпопуляционном составе «поляризованных» Т-хелперов периферической крови при рассеянном склерозе	1184
В. А. Колупаев, С. Л. Сашенков, И. Ю. Мельников, Н. А. Лифанов, И. Л. Колупаева	
Содержание CD-лимфоцитов и гуморальных факторов иммунитета у спортсменов при разном состоянии нейтрофилов периферической крови	1192
А. М. Коркмазов, Н. В. Корнова, А. С. Белошангин, А. М. Солтыс, А. А. Санюкович	
Роль цитокинов в хирургическом стресс ответе в раннем послеоперационном периоде у ринохирургических больных	1201
Е. Г. Костоломова, Ю. Г. Суховой, И. Г. Унгер	
Дозазависимое влияние лиофилизированного экстракта клеток куриного эмбриона на индуцированный апоптоз моноцитов в условиях <i>in vitro</i>	1206
Л. С. Латюшина, А. В. Пиотрович, Л. Ю. Малышева, Т. В. Артюхевич, Е. В. Кузьмина	
Иммунологические особенности развития ранней формы периимплантита и влияние топической иммунотерапии на саливаторный уровень цитокинов при проведении дентальной имплантации	1211
Е. В. Маркова, И. В. Савкин, М. А. Князева, Т. В. Шушпанова, Т. П. Новожеева	
Психонейроиммуномодулирующее влияние оригинального антиконвульсанта при экспериментальном алкоголизме	1217
Дж. Т. Маммедова, Л. А. Бурова, А. Б. Малашичева, Д. С. Семёнова, И. С. Фрейдлин, Э. А. Старикова	
Влияние аргининдеиминазы <i>Streptooccus pyogenes</i> на пролиферативную активность и экспрессию активационных маркеров эндотелиальных клеток вены пупочного канатика человека	1224
С. Е. Никонова, Л. В. Рябова, К. В. Никушкина, И. В. Емельянов	
Иммунологические изменения у больных хронической обструктивной болезнью легких	1232
М. В. Осиков, Е. В. Симонян, А. Е. Бакеева, М. С. Бойко	
Сравнительный анализ влияния куркумина в составе ректальных суппозиторий на концентрацию IgG и IgM в сыворотке при экспериментальной болезни Крона	1235
И. А. Пашнина, Е. В. Власова, С. С. Дерябина	
Клинико-лабораторная характеристика пациентов с синдромом Ди-Джорджи	1239
И. А. Пашнина, И. М. Криволапова	
Уровень интерлейкина 17 и интерферона $\gamma$ в супернатантах культур цельной крови при стимуляции антителами к CD3 и CD28 у детей с артритом различной этиологии	1244

<i>А. Ю. Савочкина, О. С. Абрамовских, Э. Н. Мякишева, К. А. Абрамовских</i>	
Участие плазмы беременных женщин в процессе формирования внеклеточных сетей нейтрофильными гранулоцитами	1249
<i>К. С. Савчук, Л. В. Рябова, К. В. Никушкина, И. Л. Батурина</i>	
Характеристика иммунного статуса у больных сахарным диабетом 2 типа с атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей	1254
<i>Н. Г. Саркисян, Н. С. Чумаков, М. А. Гренадерова</i>	
Экспериментальная оценка эффективности пептидсодержащего препарата в лечении хронического пародонтита	1258
<i>Е. В. Серенко, М. А. Княжева</i>	
Психофизиологические показатели у мышей-реципиентов после трансплантации модулированных иммунных клеток	1263
<i>А. Ю. Сидоров, Ю. В. Коренчук, Л. В. Бедулева, И. В. Меньшиков, А. С. Терентьев, Т. В. Храмова</i>	
Исследование устойчивости неоэпитопов Fc фрагментов IgG обладающих иммуносупрессивными свойствами к удалению модифицирующего агента, необходимого для их формирования	1269
<i>М. В. Силкина, А. С. Карцева, О. В. Калмантаева, М. М. Rogozin, В. В. Фирстова, И. Г. Шемякин</i>	
Оценка иммунологической эффективности вакцинации людей против сибирской язвы	1274
<i>Е. В. Симонян, М. С. Бойко</i>	
Концентрация IgG и IgM при экспериментальном язвенном колите в условиях применения ректальных суппозиторий с витамином D3	1280
<i>К. Г. Старкова, Е. А. Отавина</i>	
Особенности продукции цитокинов <i>ex vivo</i> у детей в условиях экспозиции стронцием	1284
<i>Д. С. Сташкевич, А. Л. Бурмистрова</i>	
Генетический полиморфизм толл-подобного рецептора 2 у больных ревматоидным артритом русской популяции Челябинской области	1289
<i>В. П. Тимганова, М. С. Бочкова, А. П. Калугина, П. В. Храмов, М. Б. Раев, С. А. Заморина</i>	
Влияние трофобластического $\beta 1$ -гликопротеина на дифференцировку и пролиферацию Т-хелперов, поляризованных в фенотип Th17	1293
<i>Н. В. Тюменцева, Ю. С. Храмова, О. С. Арташян, Р. К. Гафарова</i>	
Влияние иммунной системы на регенераторные процессы печени при остром токсическом гепатите	1298
<i>Ю. А. Челакова, М. А. Гусельников</i>	
Особенности иммунной регуляции у взрослого населения, проживающего в условиях аэрогенной экспозиции алюминием	1304
<i>И. Л. Шаравьева, С. В. Гейн</i>	
Постстрессорные изменения функциональной активности клеток перитонеальной полости мышей	1308
<i>Н. М. Шлепотина, О. Л. Колесников, Ю. С. Шишкова, И. В. Галагудин, Е. В. Калита, А. Р. Ткачёва, Д. Г. Ким</i>	
Антимикробный эффект некоторых соединений платины и одного из производных пиридиния в отношении <i>Escherichia coli</i>	1313

# CONTENTS

Vol. 13 (22), No 3, 2019

## Research Articles

- K. S. Abramov, E. V. Davydova, M. V. Osikov*  
Comparative evaluation of indicators of apoptosis and proliferation in the isolated fracture of the femoral bone in conditions of system ozonotherapy 1088
- I. N. Alikina*  
Assessment of cell-mediated immunity in workers employed in underground chrome ore mining 1092
- A. V. Vinogradov, A. V. Rezykin, E. A. Partylova, S. V. Sazonov, A. G. Sergeev*  
Immunological evaluation and treatment of resistance acute myeloid leukemia in young adult (case report) 1097
- E. F. Galimova, O. Yu. Travnikov, Z. G. Khaibullina, A. Z. Murtazina, T. S. Asadullina, Sh. N. Galimov*  
The contents of cytokines in semen in infertility associated with chronic prostatitis 1102
- I. F. Gette, V. V. Emelianov, A. V. Belousova, I. G. Danilova, L. P. Sidorova, T. A. Tseitler*  
The influence of a number of substituted 1,3,4-6H-thiadiazines on the content of cytokines in blood plasma of rats with experimental diabetes mellitus type 2 1107
- O. A. Gizinger, O. R. Ziganshin, A. O. Laknitskaya*  
Bactericidal effects of monochromatic light 635 nm and 450 nm, with respect to *Staphylococcus aureus* in patients with stafilodermy 1112
- O. A. Gizinger, N. V. Kornova, K. S. Zyryanova, R. A. Ivanova, V. E. Nazarova*  
Efficiency of complex therapy of chronic adenoiditis using monochromatic coherent radiation with a wave length of 635 nm 1116
- I. A. Goldina, E. V. Markova, I. A. Orlovskaya, L. B. Toporkova*  
Immunopoiesis-modulating properties of bioflavonoides original complex «Epigenorm antivir» 1124
- O. V. Dolgikh, O. A. Kazakova, A. V. Krivtsov*  
Assessment of CD127<sup>-</sup> and CD95<sup>+</sup> expression and genetic profile of women of reproductive age exposed to phenol 1128
- O. V. Dolgikh, A. A. Mazunina, A. V. Krivtsov, M. A. Gusel'nikov*  
Immunobiochemical indicators and comparative evaluation of polymorphism of children's population genes in south Siberia 1133
- V. V. Emelianov, I. G. Danilova, S. A. Brilliant, I. F. Gette, L. P. Sidorova, T. A. Tseitler, Yu. N. Klyuyeva*  
Comparative characteristics of the effect of substituted 1,3,4-6H-thiadiazines on the peripheral blood indexed of rats with alloxan diabetes mellitus 1138
- E. N. Ermolaeva, S. L. Sashenkov, S. A. Kantjukov, V. I. Petuhova, V. P. Jakovleva*  
Influence of ceruloplasmin on cytokine production during chronic physical loads of submaximal power 1144
- N. A. Zabokritskiy*  
Immunobiological aspects of the application of the new metabiotics 1149
- N. A. Zabokritskiy*  
Immunobiological aspects of the application of the new metabiotics 1156
- S. A. Zamorina, L. S. Litvinova, N. M. Todosenko, V. P. Timganova, M. S. Bochkova, K. Y. Shardina, P. V. Khramtsov, M. B. Raev, V. A. Chereshnev*  
Influence of alpha-fetoprotein on cytokin profile of activated T-helpers 1161

<i>A. V. Zurochka, V. A. Zurochka, L. O. Fomina, A. I. Fayzullina, M. A. Dobrynina, V. A. Gritsenko</i> Estimation of cytokin-like activity of <i>Staphylococcus aureus</i> depending on the availability of genetic determinant of styphylococcal protein A	1167
<i>A. V. Zurochka, V. A. Zurochka, L. O. Fomina, A. I. Fayzullina, M. A. Dobrynina, V. A. Gritsenko</i> Detection of cytokine-like substances with the help of a test system for the determination of cytokines in a mouse in <i>Staphylococcus aureus</i> , opposite for <i>SPA</i> gene	1172
<i>E. N. Isaeva, S. A. Sineva, N. V. Pigareva, A. S. Simbirtsev</i> Monoclonal antibody to human PD-1 end determination of its specific activity by flow cytometry	1176
<i>A. S. Kartseva, M. V. Silkina, O. V. Kalmantaeva, R. I. Mironova, V. V. Firstova, V. M. Pavlov, I. G. Shemyakin</i> Comparison of the early immune response of mice immunized by tularemia vaccine strain and its derivatives	1183
<i>I. V. Kudryavtsev, A. G. Ilves, A. V. Il'chenko, I. I. Krobinets, O. M. Novoselova, K. S. Rubanik, M. K. Serebryakova, L. N. Prakhova</i> Imbalance in peripheral blood "polarized" T-helper subsets during multiply sclerosis	1191
<i>V. A. Kolupaev, S. L. Sashenkov, I. Y. Mel'nikov, N. A. Lifanov, I. L. Kolupaeva</i> The content of CD-lymphocytes and humoral factors in athletes with a different state of peripheral blood neutrophils	1200
<i>A. M. Korkmazov, N. V. Kornova, A. S. Beloshangin, A. M. Soltys, A. A. Sanyukovich</i> The role of cytokines in a surgical stress response to early postoperative period in rhinosurgery patients	1204
<i>E. G. Kostolomova, U. G. Suhovej, I. G. Unger</i> Dependable effect of lyophilized extract of chicken embryo cells on induced apoptosis of monocytes under <i>in vitro</i> conditions	1210
<i>L. S. Latyushina, A. V. Piotrovich, L. J. Malysheva, T. V. Artyukhevich, E. V. Kuzmina</i> Immunological features of the development early form periimplants and the topical immunotherapy effect on the salivator level cytokines during dental implantation	1216
<i>E. V. Markova, I. V. Savkin, M. A. Knyazheva, T. V. Shushpanova, T. P. Novozheeva</i> Psychoneuroimmunomodulatory effects of the original anticonvulsant at experimental alcoholism	1222
<i>J. T. Mammedova, L. A. Burova, A. B. Malashicheva, D. S. Semenova, I. S. Freidlin, E. A. Starikova</i> The effect of <i>Streptococcus pyogenes</i> arginine deiminase on human umbilical vein endothelial cells proliferation and activation markers expression	1231
<i>S. E. Nikonova, L. V. Ryabova, K. V. Nikushkina, I. V. Emelyanov</i> Immunological changes immunological changes	1234
<i>M. V. Osikov, E. V. Simonyan, A. E. Bakeeva, M. S. Boiko</i> Comparative analysis of the influence of rectal suppositories with cucurmin on the concentration of IgG and IgM in blood serum in experimental Crohn's disease	1238
<i>I. A. Pashnina, E. V. Vlasova, S. S. Deryabina</i> Clinical-laboratory characteristic of patients with syndrome Digeorge	1243
<i>I. A. Pashnina, I. M. Krivolapova</i> The level of interleukin-17 and interferon $\gamma$ in cell's cultures supernatants under stimulation by antibodies to CD3 and CD28 in children with arthritis of different etiology	1248
<i>A. Yu. Savochkina, O. S. Abramovskikh, E. N. Myakisheva, K. A. Abramovskikh</i> Participation of plasma of pregnant women during formation of extracellular traps neutrophil	1253
<i>K. S. Savchuk, L. V. Ryabova, K. V. Nikushkina, I. L. Baturina</i> Characteristic of immunologiical status at patients with diabetes mellitus type2 combined with atherosclerotic arterial disease of lower limbs	1257

<i>N. G. Sarkisyan, N. S. Chumakov, M. A. Grenaderova</i>	
Experimental evaluation of the efficiency of the peptide-containing drug in the treatment of chronic periodontitis	1262
<i>E. V. Serenko, M. A. Knyazheva</i>	
Psychophysiological indicators in mice recipients after modulated immune cells transplantation	1268
<i>A. Yu. Sidorov, Yu. V. Korenchuk, L. V. Beduleva, I. V. Menshikov, A. S. Terentiev, T. V. Khranova</i>	
The stability of neoepitopes recognized by regulatory rheumatoid factor after removing the modifying agent required for their formation	1273
<i>M. V. Silkina, A. S. Kartseva, O. V. Kalmantaeva, M. M. Rogozin, V. V. Firstova, I. G. Shemyakin</i>	
Estimation of immunological efficiency of people vaccinated against anthrax	1279
<i>E. V. Simonyan, M. S. Boyko</i>	
Study of the content of IgG and IgM level in experimental ulcer and in the conditions of rectal suppositories with vitamin D3	1283
<i>K. G. Starkova, E. A. Otavina</i>	
Features of cytokine production <i>ex vivo</i> in children under strontium exposure	1288
<i>D.S. Stashkevich, A. L. Burmistrova</i>	
Genetic polymorphism of TLR2 in rheumatoid arthritis patients russian population of Chelyabinsk region	1292
<i>V. P. Timganova, M. S. Bochkova, A. P. Kalugina, P. V. Khramtsov, M. B. Raev, S. A. Zamorina</i>	
Effect of pregnancy-specific $\beta$ 1-glycoprotein on the differentiation and proliferation of Th17-polarized helper T cells	1297
<i>N. V. Tyumentseva, Y. S. Khramtsova, O. S. Artashyan, R. K. Gafarova</i>	
The effect of the immune system on regenerative processes of the liver in acute toxic hepatitis	1303
<i>J. A. Chelakova, M. A. Guselnikov</i>	
Peculiarities of immunoregulation in adults living under aerogenic exposure to aluminium	1307
<i>I. L. Sharav'eva, S. V. Gein</i>	
Poststressor changes in functional activity of cells of peritoneal cavity of mice	1312
<i>N. M. Shlepotina, O. L. Kolesnikov, Yu. S. Shishkova, I. V. Galagudin, E. V. Kalita, A. R. Tkachyova, D. G. Kim</i>	
Antimicrobial effect of some compounds of platinum and one of pyridinium derivatives in relation to <i>Escherichia coli</i>	1317

---

<b>Author Index</b>	1319
---------------------	------

---

**ТЕМАТИЧЕСКИЙ ВЫПУСК**  
**XIV Всероссийская конференция с международным участием**  
**«Иммунологические чтения в г. Челябинске»**  
**Международная школа с элементами школы для молодых ученых**  
**«Проточная цитометрия в клинической**  
**лабораторной диагностике»**  
Челябинск, 25-31 августа 2019 года

**ОГРАНИЗАТОРЫ:**

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Российская академия наук  
Уральское отделение Российской академии наук  
Министерство Здравоохранения Челябинской области  
Российское научное общество иммунологов  
ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский)  
ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН  
ФГБУН Уральский научно-практический центр радиационной медицины ФМБА России  
ФГБОУ ВО Южноуральский государственный медицинский университет  
ООО «Академический инновационный научный центр»  
ЧУ ДПО МР «Новый уровень»  
ООО «Мерина»

**Конференция посвящается 60-летию юбилею д.м.н., профессора М. Б. Раева**

**КОНФЕРЕНЦИЯ И ШКОЛА ПРОВОДЯТСЯ ПРИ ПОДДЕРЖКЕ КОМПАНИЙ**

ООО «БекменКультер» – представительство компании BeckmanCoulter в России и СНГ, Москва;  
ООО «ЛабТэк Лтд», Санкт-Петербург; ЗАО «БиоХимМак», Москва; АО «Пептек», Москва;  
ООО «Диаэм», Москва; ЗАО «Сандоз», Москва; ООО «Термофишер», Москва;  
ООО «БИОТЕХ», Санкт-Петербург; АО «Нижфарм», Москва; ООО «ФЕРОН», Москва

**ОРГКОМИТЕТ КОНФЕРЕНЦИИ**

**Сопредседатели:**

Черешнев Валерий Александрович, академик РАН, профессор, д.м.н.  
Зурочка Александр Владимирович, профессор, д.м.н.

**Заместитель председателя:**

Хайдуков Сергей Валерьевич, д.б.н.

**ЧЛЕНЫ ОРГКОМИТЕТА:**

Абрамова Наталья Николаевна, к.м.н.  
Аклеев Александр Васильевич, ЗДНРФ,  
профессор, д.м.н.  
Борисов Александр Геннадьевич, к.м.н.  
Бычкова Наталья Владимировна, к.б.н.  
Долгушин Илья Ильич, академик РАН, ЗДНР,  
профессор, д.м.н.  
Заботина Татьяна Николаевна, профессор, д.б.н.  
Заморина Светлана Анатольевна, д.б.н.  
Зурочка Владимир Александрович, д.м.н.  
Калинина Наталия Михайловна, профессор, д.м.н.  
Козлов Владимир Александрович, академик РАН,  
профессор, д.м.н.  
Козлов Иван Генрихович, профессор, д.м.н.  
Костоломова Елена Геннадьевна, к.б.н.  
Кудрявцев Игорь Владимирович, к.б.н.

Лагерева Юлия Геннадьевна, д.б.н.  
Партылова Елена Александровна, к.м.н.  
Пашнина Ирина Александровна, д.б.н.  
Пинелис Марина Леонидовна, к.м.н.  
Продеус Андрей Петрович, профессор, д.м.н.  
Раев Михаил Борисович, д.б.н.  
Симбирцев Андрей Семенович, член-корреспондент  
РАН, профессор, д.м.н.  
Семикина Елена Леонидовна, д.м.н.  
Суховей Юрий Геннадьевич, профессор, д.м.н.  
Тотоян Арег Артемович, академик РАН,  
профессор, д.м.н.  
Топтыгина Анна Павловна, д.м.н.  
Черешнева Маргарита Владимировна, ЗДНРФ,  
профессор, д.м.н.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ АПОПТОЗА И ПРОЛИФЕРАЦИИ ПРИ ИЗОЛИРОВАННОМ ПЕРЕЛОМЕ БЕДРЕННОЙ КОСТИ В УСЛОВИЯХ СИСТЕМНОЙ ОЗОНОТЕРАПИИ

© 2019 г. К. С. Абрамов\*, Е. В. Давыдова, М. В. Осиков

\*E-mail: kirill-abramov86@mail.ru

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет России, Челябинск, Россия

Поступила: 24.05.2019. Принята: 28.06.2019

Исследованы цитометрические показатели апоптоза и пролиферации у 20 мужчин с изолированным переломом бедренной кости в условиях применения системной озонотерапии. Показано, что при переломе бедренной кости имеет место повышение абсолютного и относительного количества Т-лимфоцитов с экспрессией рецепторов готовности к реализации апоптоза и уровня лимфоцитов с цитометрическими признаками апоптоза (гиподиплоидный пик). Применение озонотерапии позитивно влияет на механизмы выживаемости иммунных клеток, вне зависимости от их фенотипа, за счет повышения экспрессии bcl-2 до значений контрольной группы, что можно расценивать как один из механизмов, позволяющих регулировать и проводить отбор эффективных В-лимфоцитов, способных наработать достаточный уровень противинфекционных антител в ответ на травму.

**Ключевые слова:** перелом бедра, озонотерапия, апоптоз, пролиферация

DOI: 10.31857/S102872210007230-8

**Адрес:** Челябинск, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Абрамов Кирилл Сергеевич. Тел.: +7904971 61 52

**E-mail:** kirill-abramov86@mail.ru

**Авторы:**

**Абрамов К. С.**, старший лаборант кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

**Давыдова Е. В.**, д.м.н., доцент, профессор кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

**Осиков М. В.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Согласно статистическим данным, травматическое повреждение бедренной кости в результате дорожно-транспортных происшествий составляет до 10%, что в абсолютных значениях составляет от 1 до 3 млн. человек [1]. Уже в первые минуты после травмы происходит включение

системного ответа организма, ведущим звеном в котором играют нейро-иммуноэндокринные механизмы реагирования [2]. Эффективность хирургического лечения, сроки репарации костной ткани во многом зависят от реализации са-ногенетических процессов как в самой костной ткани, так и в виде функциональной интеграции с другими системами организма. Далеко не последнюю роль в процессах репарации костной ткани играют процессы резорбции и остеогенеза, обеспечиваемые в том числе и секреторными продуктами иммунных клеток и их количественным соотношением [3].

В настоящее время при лечении травматических повреждений опорно-двигательного аппарата наряду с хирургическими методами лечения, активно применяются методы эфферентной терапии, в этом плане перспективно применение озонотерапии, поскольку механизм терапевтического действия озона многогранен [4]. Поступление озона в организм приводит к умеренному окислительному стрессу, прежде всего, за счет взаимодействия с полиненасыщенными

жирными кислотами и водой, генерации активных метаболитов кислорода, проявляя свои бактерицидные, антиоксидантные свойства. Известны и иммуномодулирующие свойства озона и его метаболитов, с успехом применяемые для лечения различной хронической хирургической патологии.

**Цель исследования** заключалась в сравнительной оценке показателей апоптоза и пролиферации при изолированном переломе бедренной кости в условиях системной озонотерапии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие 20 пациентов мужского пола с изолированным переломом бедренной кости, средний возраст  $43,5 \pm 5,4$  года, находящихся на лечении в отделении травматологии и ортопедии № 2 ГБУЗ Челябинская областная клиническая больница. Всем пациентам до начала хирургического лечения на 5–7 сутки после травмы производился забор венозной крови для иммунологического обследования, натошак (вторая группа,  $n=20$ ). Со вторых суток после оперативного лечения пациенты получали озонотерапию в виде процедуры малой аутогемотерапии (МАГТ) на озонотерапевтической автоматической установке с деструктором озона УОТА-60-01 «Медозон» производства ООО «Медозон», Москва. Концентрация озона в озонкислородной смеси составляла 20 мг/л, в объеме 10 мл. Объем венозной крови составлял 10 мл. Вводили внутримышечно, в ягодичную или бедренную область. Курс 7–9 инъекций через день. Сразу после окончания курса МАГТ производили контрольный забор венозной крови для иммунологического тестирования (третья группа,  $n=20$ ). Контрольную группу составили 30 условно здоровых мужчин, средний возраст  $48,5 \pm 5,2$  года (первая группа). Иммунологическое исследование крови проводили на проточном цитофлуориметре *Becton Dickinson FACSCanto 10*. Непосредственно для окрашивания нами были использованы двухпараметрические реагенты линии *IOTest*. Окрашивание моноклональными антителами проводили в цельной крови. По окончании инкубации проводили лизис эритроцитов и фиксацию лейкоцитов с использованием лизирующего комплекта реагентов *Immuno-Prep™*. Полученные данные анализировали в рамках программы *CellQuest*.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программы *Statistica 10.0*.

Используя критерий Манна-Уитни, различия считали достоверными при  $p < 0,05$ . [5].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные, параметров апоптоза и пролиферации лимфоцитов при изолированном переломе бедренной кости, в условиях системной озонотерапии, представленные в **Таблице 1**, показывают, что в ответ на травму происходит абсолютное и относительное повышение экспрессии рецепторов готовности к реализации апоптоза на Т-лимфоцитах и абсолютного числа общей популяции лимфоцитов с цитометрическими признаками апоптоза, регистрируемыми по выраженности гиподиплоидного пика в сравнении с контрольной группой. После курса озонотерапии показатели апоптоза лимфоцитов не претерпевали значительных изменений, в сравнении с показателями второй группы. Известно, что при активации клеток  $CD95^+$  в большей степени экспрессируется на  $CD4^+$ -позитивных клетках, и, взаимодействуя с *FasL* в виде мембраноассоциированного или растворимого белка *Fas/CD95<sup>+</sup>*, становится основным механизмом апоптотической гибели клеток-мишеней при инфекционно-воспалительных процессах в организме. При этом лимфоциты, находящиеся в состоянии пролиферации (фаза митоза) во всех группах не имели достоверных различий, однако, индекс соотношения пролиферации/апоптоза в контрольной группе был значимо более высоким. Пролиферация как проявление активации иммунных клеток носит «позитивный» характер, при этом численность клеток, находящихся в фазе пролиферации ( $S+G2+M$ ), на фоне применения озонотерапии существенно не отличается от показателей контрольной группы и до лечения.

Для оценки вклада антиапоптогенного белка *bcl-2* в механизмы выживаемости лимфоцитов при переломе бедра и в условиях применения озонотерапии нами проведено цитометрическое определение экспрессии ингибитора апоптоза *bcl-2* на Т- и В-лимфоцитах. Установлено, что при травме бедра экспрессия *bcl-2* на Т- и В-лимфоцитах снижена и достигает уровня контрольной группы, после применения озонотерапии, что свидетельствует о позитивном влиянии озона на механизмы выживаемости иммунных клеток, вне зависимости от их фенотипа. Известно, что *bcl-2* функционирует как антиапоптогенный фактор, связывающий и инактивирующий проапоптотический белок

**Таблица 1.** Показатели апоптоза и пролиферации лимфоцитов в условиях применения озонотерапии

Параметры		Группа 1 Контрольная n=10	Группа 2 Пациенты с переломом бедра до лечения n=20	Группа 3 Пациенты после озонотерапии n=20	p
Апоптоз (гиподиплоидный пик)	%	4,65 ± 0,41	6,83 ± 0,18	7,23 ± 0,12	
	abs	0,02 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01	<0,01 <sub>1-2</sub> <0,01 <sub>1-3</sub>
Фаза митоза (пролиферация) (S+G2+M)	%	4,13 ± 1,15	3,14 ± 1,4	3,28 ± 1,23	
	abs	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,03	0,13 ± 0,01	
Индекс пролиферации/апоптоза		6,8 ± 0,1	1,2 ± 0,02	1,62 ± 0,03	<0,01 <sub>1-2</sub> <0,01 <sub>1-3</sub>
CD3 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup> лимфоциты, %		15,2 ± 1,46	28,3 ± 4,15	36,2 ± 6,2	<0,01 <sub>1-2</sub> <0,01 <sub>1-3</sub>
CD3 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup> лимфоциты, x 10 <sup>6</sup>		218,3 ± 11,8	680,1 ± 21,7	870,1 ± 20,1	<0,01 <sub>1-2</sub> <0,01 <sub>1-3</sub>
CD20 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup> лимфоциты, %		8,2 ± 0,23	8,8 ± 0,3	8,9 ± 0,1	
CD20 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup> лимфоциты, x 10 <sup>6</sup> abs		19,2 ± 1,2	20,5 ± 1,3	21,3 ± 1,6	
CD3 <sup>+</sup> bcl-2 лимфоциты, %		0,46 ± 0,2	0,35 ± 0,8	0,45 ± 0,1	
CD3 <sup>+</sup> bcl-2 лимфоциты, x 10 <sup>6</sup>		12,3 ± 0,3	8,0 ± 0,4	10,1 ± 0,1	<0,01 <sub>1-2</sub> <0,01 <sub>2-3</sub>
CD20 <sup>+</sup> bcl-2 лимфоциты, %		4,26 ± 0,6	1,25 ± 0,5	5,53 ± 1,7	<0,01 <sub>1-2</sub> <0,01 <sub>2-3</sub>
CD20 <sup>+</sup> bcl-2 лимфоциты, x 10 <sup>6</sup>		4,9 ± 0,03	2,1 ± 0,02	7,2 ± 0,1	<0,01 <sub>1-2</sub> <0,01 <sub>2-3</sub>

**Примечание:** p – показатель значимости различий между группами по критерию Манна-Уитни

Вах с формированием комплекса с фактором апоптоза АРАF1, предотвращая способность последнего активировать каспаза-зависимый путь апоптоза. Примечательно, что при развитии В-клеток bcl-2 экспрессируется на всех стадиях развития клетки и повышение его экспрессии после применения озонотерапии, можно расценить как один из механизмов, позволяющих регулировать и проводить отбор только эффективных В-лимфоцитов, способных наработать достаточный уровень противинфекционных антител в ответ на травму.

## ВЫВОДЫ

1. Изолированный перелом бедренной кости сопровождается абсолютным и относительным повышением числа клеток с экспрессией рецепторов готовности к реализации апоптоза на Т-лимфоцитах и лимфоцитов с цитометрическими признаками апоптоза.

2. Применение озонотерапии в комплексном лечении переломов бедренной кости позволя-

ет нормализовать уровень антиапоптогенного фактора bcl-2 на Т- и В-лимфоцитах снижена до значений контрольной группы.

3. Показатели пролиферации как проявления активации иммунных клеток, на фоне применения озонотерапии не имеют различий с показателями контрольной группы и до лечения, за исключением индекса соотношения пролиферации/апоптоза

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Губайдуллин М. И., Зарков С. И. Медико-социальная оценка случаев с благоприятными исходами дорожно-транспортных травм на госпитальном этапе. Современные проблемы науки и образования. 2012, 1. [Электр. ресурс] (URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=5513>) [Gubaydullin M. I., Zarkov S. I. Medico-social assessment of cases with favorable outcomes of road traffic injuries at the hospital stage. Modern problems of science and education. 2012, 1. [An electronic resource] (URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=5513>).

2. *Amarante-Mendes G.P., Adjemian S., Branco L. M.* Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Front Immunol.* 2018, 9:2379. doi: 10.3389/fimmu.2018.02379.
3. *Осиков М. В., Давыдова Е. В., Абрамов К. С.* Врожденный иммунитет при изолированных переломах бедренной кости. Современные проблемы науки и образования. 2019, 1. [Электр. ресурс] (URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=28540>). [*Osikov M. V., Davydova E. V., Abramov K. S.* Congenital immunity in isolated fractures of the femur. *Modern problems of science and education.* 2019, 1. [An electronic resource] URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=28540>)
4. *Sweet F., Kao M.-S., Lee S.-C. D., Hagar W. L., Sweet W. E.* Ozone selectively inhibits growth of human cancer cells. *Science.* 1980; 209(4459): 931–933.
5. *Медик В. А., Токмачев М. С., Фишман Б. Б.* Статистика в медицине и биологии. «Теоретическая статистика». Под ред. Комарова Ю. М.. Медицина, Москва, 2000, 1, 454. [*Medik V. A., Tokmachev M. S., Fishman B. B.* Statistika in medicine and biology. “Theoretical statistics”. Under the editorship of Yu. M. Komarov. *Medicine, Moscow, 2000, 1, 454.*]

## COMPARATIVE EVALUATION OF INDICATORS OF APOPTOSIS AND PROLIFERATION IN THE ISOLATED FRACTURE OF THE FEMORAL BONE IN CONDITIONS OF SYSTEM OZONOTHERAPY

© 2019 K. S. Abramov\*, E. V. Davydova, M. V. Osikov

\*E-mail: [kirill-abramov86@mail.ru](mailto:kirill-abramov86@mail.ru)

South Ural State Medical University” of the Ministry of Health of Russia,  
Chelyabinsk, Russia

Received: 24.05.2019. Accepted: 28.06.2019

The cytometric parameters of apoptosis and proliferation were studied in 20 men with an isolated fracture of the femur under the conditions of using systemic ozone therapy. It is shown that in case of a fracture of the femur, there is an increase in the absolute and relative number of T-lymphocytes with the expression of receptor readiness for apoptosis and the level of lymphocytes with cytometric signs of apoptosis (hypodiploid peak). The use of ozone therapy has a positive effect on the mechanisms of survival of immune cells, regardless of their phenotype, by increasing the expression of bcl-2 to the values of the control group, which can be regarded as one of the mechanisms that allow to regulate and carry out the selection of effective B-lymphocytes capable of accumulating a sufficient anti-infective antibodies in response to injury.

*Key words:* hip fracture, ozone therapy, apoptosis, proliferation

### Authors:

**Abramov K. S.**, ✉ Senior Laboratory Assistant, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Ministry of Health of Russia, Chelyabinsk, Russia;

Chelyabinsk, South Ural State Medical University of the Ministry of Health of Russia. Phone: +7904971 61 52.

**E-mail:** [kirill-abramov86@mail.ru](mailto:kirill-abramov86@mail.ru);

**Davydova E. V.**, MD, associate professor, professor of the Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Ministry of Health of Russia, Chelyabinsk, Russia;

**Osikov M. V.**, MD, Professor, Head. Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Ministry of Health of Russia, Chelyabinsk, Russia.

## ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У РАБОТНИКОВ ПРЕДПРИЯТИЯ ПО ПОДЗЕМНОЙ ДОБЫЧЕ ХРОМОВОЙ РУДЫ

© 2019 г. И. Н. Аликина

E-mail: oleg@fcrisk.ru

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровья населения», Пермь, Россия

Поступила: 24.05.2019. Принята: 28.06.2019

Иммунологическое исследование особенностей нарушения клеточного звена иммунитета у работников предприятия по добыче хромовых руд выявило избыточную продукцию супрессорных Т-регуляторных клеток CD4<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>, апоптического белка Вах, наблюдалось повышение показателя специфической сенсibilизации IgE к хрому по отношению к группе сравнения, ассоциированное с повышенным содержанием хрома в крови (более чем в 5 раз по отношению к референтному уровню). Установлено достоверное снижение показателей CD-иммунограммы: CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>, снижение экспрессии внутриклеточного белкового фактора Bcl-2, транскрипционного фактора, регулирующего клеточный цикл – p53, рецептора к фактору некроза опухоли TNFR по сравнению с значениями показателей работающих в условиях вне воздействия исследуемых производственных факторов (p<0,05). Таким образом, условия производства, ассоциированные с нагрузкой гаптенами (хром), формируют дисбаланс клеточной регуляции, нарушая программированную процедуру клеточной гибели (апоптоза).

**Ключевые слова:** кластер дифференцировки, иммунная система, хром

DOI: 10.31857/S102872210007231-9

**Адрес:** Пермь, ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровьем населения», Долгих Олег Владимирович.

Тел.: (342) 236-39-30, E-mail: oleg@fcrisk.ru

**Авторы:**

Аликина И. Н., младший научный сотрудник лаборатории клеточных методов диагностики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», Пермь, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Предприятия горнорудной промышленности занимают одно из ведущих мест в экономике страны, продолжают характеризоваться наиболее вредными и опасными условиями труда. На этапе технического перевооружения предприятий подземной и открытой добычи руд за счёт привлечения мощной, высокопроизводительной горной техники увеличивается производительность труда, снижается численность работающих [1]. Профессиональная заболеваемость горнорабочих является важнейшей медицинской, социальной и экономической проблемой, поскольку около 40% работающих в этой отрасли промышленности продолжают трудиться во

вредных условиях. Даже при непродолжительном воздействии профессиональных факторов возникают отклонения в деятельности функциональных систем организма – переход от приспособительных реакций к патологическим процессам. Более длительное воздействие превышает риск развития профессиональных заболеваний и инвалидизации рабочих [2]. К факторам риска возникновения профзаболеваний у горнорабочих относится специфика и организация труда в шахтах, определяющие последовательность различных трудоемких операций, темп выполнения работ при чрезмерной физической нагрузке, вынужденное положение тела, выполнение вспомогательных операций вручную, монотонные однообразные движения [3]. Более 85% случаев заболеваний приходится на четыре вида болезней: пылевые заболевания органов дыхания (30%), кохлеарные невриты (8%), болезни опорно-двигательного аппарата (19%), вибрационная болезнь (28%). Среди прочих видов болезней зарегистрированы заболевания, связанные с токсическими воздействиями раз-

личных химических веществ (2,9%), аллергические заболевания и нарушения иммунной системы (1,1%) [4–6]. Иммунная система, являясь одной из важнейших гомеостатических систем, занимает центральное место в выработке адаптационной реакции на воздействие факторов окружающей среды. Результатом взаимодействия производственных факторов с иммунной системой может проявляться в снижении функции иммунитета, вызывать вторичные иммунодефицитные состояния по Т- и В-типу и смешанного характера. [7]. Хром является высококанцерогенным металлом и токсические процессы, развивающиеся в результате его действия на организм могут проявляться в виде ухудшения основных показателей иммунологической реактивности и увеличения общей заболеваемости населения, включая рост злокачественных новообразований [8]. В настоящее время весьма актуальной проблемой является оценка влияния на состояние здоровья и, в частности, на иммунный статус человека воздействия вредных производственных факторов.

**Целью** данного исследования является оценка показателей клеточного иммунитета у работников, занятых на выполнении подземных горных работ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись работники ( $n=50$ ) предприятия по подземной добыче хромовой руды (группа наблюдения). Основными производственными факторами, воздействующими, на работников являются шум, вибрация, тяжесть трудового процесса, охлаждающий микроклимат, а также пыль и химические вещества (хром), присутствующие в воздухе рабочей зоны. Группу сравнения составили работники ( $n=35$ ), работающие в условиях вне воздействия исследуемых производственных факторов – руководители и специалисты административно-управленческого персонала предприятия.

Изучение иммунного статуса рабочих включало анализ общего содержания лейкоцитов, а также относительного и абсолютного содержания лимфоцитов стандартными методами лабораторного анализа. Определение относительного и абсолютного количества субпопуляций лимфоцитов осуществляли по экспрессии соответствующих мембранных маркеров (Т-регуляторные лимфоциты (Treg) – CD127<sup>-</sup>, CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, активированные Т-лимфоциты – CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, активированные Т-лимфоциты – CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>)

(«Becton Dickinson», США), а также клеток, экспрессирующих маркеры апоптоза: факторы p53, Bcl-2, Вах, рецептор к TNF $\alpha$  (TNFR1<sup>+</sup>) («Becton Dickinson», США), осуществляли на проточном цитометре FACSCalibur фирмы «Becton Dickinson» с использованием универсальной программы CellQuestPro с использованием метода мембранной иммунофлюоресценции и панели меченых моноклональных антител, при этом регистрировали суммарно не менее 10 000 событий.

Специфические антитела к поллютанту хрому определяли методом аллелгосорбентного тестирования с ферментной меткой (IgE к хрому).

Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики, рассчитывая среднее арифметическое и его стандартную ошибку ( $M \pm m$ ) и t-критерий Стьюдента для сравнения групп по количественным признакам в пакете статистического анализа Statistica 6.0 (StatSoft, США). Различия между группами считали достоверными при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование биосред показало, что у обследуемой группы наблюдения повышено более чем в 5 раз содержание хрома в крови в сравнении с референтным уровнем ( $p < 0.05$ ). Содержание хрома в моче основной группы превышало референтный уровень в 1.5 раз у 61% рабочих ( $p < 0.05$ ).

При изучении иммунного статуса установлены нарушения клеточного иммунитета рабочих группы наблюдения, которые заключались в достоверных отклонениях показателей CD-иммунограммы в сравнении с референтными значениями, а именно – повышение относительного и абсолютного содержания супрессоров иммунного ответа – CD127<sup>-</sup> у 86% и 68% работающих соответственно, повышением содержания TNFR рецептора у 69% обследуемых.

Иммунологический анализ показал, что у работающих в условиях вредных производственных факторов достоверно повышены значения относительного и абсолютного содержания НК-клеток – CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов по отношению к значениям, полученных в группе сравнения в 1.5 и 1.7 раз соответственно ( $p < 0.05$ ).

Наблюдается угнетение содержания CD25<sup>+</sup> как по сравнению с нормой, так и группой сравнения. Установлено, что у 78% обследуемых достоверно снижено в сравнении с референтным уровнем содержание активированных Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулу CD95<sup>+</sup>.

**Таблица 1.** Результаты сравнительного анализа показателей клеточного иммунитета работающих в условиях воздействия вредных производственных факторов предприятия по добыче и переработке хромовой руды

Показатель	Референтный интервал	Группа наблюдения (n=50) M±m	Группа сравнения (n=35) M±m
TNFR, %	1–1.5	3.202±0.777*	3.540±1.343
p53, %	1.2–1.8	1.849±0.457**	3.408±0.879
Vaх, %	5–9	10.125±1.311**	5.567±1.534
Vcl-2, %	1–1.5	0.833±0.233**	3.918±1.113
Treg (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> ), отн., %	0.8–1.2	2.865±0.661*	2.746±0.712
Treg (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> ) абс., 10 <sup>9</sup> /дм <sup>3</sup>	0.015–0.04	0.074±0.026*	0.059±0.018
NK (CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> ), %	5–27	16.800±2.277**	11.360±2.691
NK (CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> ), абс., 10 <sup>9</sup> /дм <sup>3</sup>	0.09–0.59	0.400±0.069**	0.229±0.055
Активированные Т-лимфоциты (CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> ), %	13–24	5.833±0.809*/**	13.000±1.951
Активированные Т-лимфоциты (CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> ), абс., 10 <sup>9</sup> /дм <sup>3</sup>	0.19–0.56	0.137±0.022*/**	0.274±0.051
Активированные Т-лимфоциты (CD3 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup> ), %	39–49	24.233±3.228*/**	33.800±3.713

**Примечание:** \* – разница достоверна относительно референтного интервала (p<0.05). \*\* – разница достоверна относительно группы сравнения (p<0.05).

Продемонстрировано, что у работающих в условиях производства хромовой руды достоверно (p<0.05) понижен уровень экспрессии p53, понижен уровень Vcl-2 относительно группы сравнения в 1.8 и 4.7 раз соответственно. У 63% обследованных наблюдается экспрессия внутриклеточного маркера Вах (p<0.05) (Таблица 1).

Наблюдается изменение гуморального звена иммунитета, который характеризуется повышением показателя специфической сенсибилизации IgE к хрому почти в 3 раза.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Достоверные изменения иммунологических показателей CD-иммунограммы и функции программированной клеточной гибели с одновременной активацией процессов сенсибилизации, ассоциируются с известными токсикологическими эффектами соединений хрома (аллергизация, онкогенез) и формируют особенности иммунологического статуса работающих на предприятии по добыче и переработке хромовых руд, которые характеризуются активацией супрессорных Т-клеточных рецепторов CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD127<sup>-</sup>, апоптического белка Вах, повышением показателя специфической сенсибилизации IgE к хрому, а также снижением показателей CD-

иммунограммы: CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>, экспрессии белков vcl-2 и p53 и рецептора к фактору некроза опухоли TNFR.

## ВЫВОДЫ

Иммунологическое исследование работников на предприятия по подземной добыче хромовой руды выявило нарушения клеточного звена иммунитета, выражающиеся в активации рецепторов CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, CD127<sup>-</sup>, белка Вах, в снижении CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>, белкового фактора Vcl-2, транскрипционного фактора p53, рецептора TNFR по сравнению с работающими в условиях вне воздействия исследуемых производственных факторов предприятия. Наблюдалось повышение показателя специфической сенсибилизации IgE к поллютанту (хрому) по отношению к группе сравнения, которое ассоциировано с повышенным содержанием данного металла в крови.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Алтынбеков Б. Е., Долтаева Б. З. Производственные и биогеохимические основы профилактики свинцовой интоксикации работников ЗАО «Южполиметалл». Медицина и экология 2000, 3, 15–18. [Altynbekov B. E., Dultaeva B. Z. Production and

- biogeochemical basis for the prevention of lead intoxication of workers of JSC “Yuzhpolimetall”. *Medicine and ecology* 2000, 3, 15–18.]
2. *Титова Е. Я.* Современные проблемы охраны здоровья работников крупного промышленного предприятия, работающих в условиях профессиональных вредностей. Анализ риска здоровью 2017, 4, 83–90. [Titova E. Ya. Modern problems of health protection of workers of a large industrial enterprise working in conditions of occupational hazards. *Health Risk Analysis* 2017, 4, 83–90.]
  3. *Жеглова А. В.* Профессиональный риск и критерии нарушения здоровья работников горнорудной промышленности. Медицина труда и промышленная экология 2009, 5, 14–18. [Zheglova A. V. Occupational risk and criticalities for disrupting the health of mining workers. *Occupational health and industrial ecology* 2009, 5, 14–18.]
  4. *Степанов С. А., Герасимова И. В., Белякова Н. А.* О групповых случаях острых профессиональных отравлений. Здоровье населения и среда обитания 1994, 3, 8–9. [Stepanov S. A., Gerasimova I. V., Belyakova N. A. On group cases of acute occupational poisoning. *Public health and habitat* 1994, 3, 8–9.]
  5. *Досмагамбетова Р. С., Аликина С. В.* Влияние ферментных антиоксидантов на состояние окислительного метаболизма при экспериментальном пылевом бронхите. *Здравоохранение Казахстана* 1998, 1(2), 19–21. [Dosmagambetova R. S., Elkina S. V. Effect of enzyme antioxidants on the state of oxidative metabolism in experimental dust bronchitis. *Health Care In Kazakhstan* 1998, 1(2), 19–21.]
  6. *Халимов Ю. Ш., Сухонос Ю. А., Ценкова Г. А.* Состояние иммунной системы и качество жизни персонала, работающего в условиях воздействия вредных производственных факторов. *Вестник Российской военно-медицинской академии* 2016, 2(46), 7–12. [Khalimov Y. S., Swan goose Y. A., Tsep-kova A. G. The state of the immune system and the quality of life of personnel working under the influence of harmful production factors. *Bulletin of the Russian military medical Academy* 2016, 2(46), 7–12.]
  7. *Долгих О. В., Кривцов А. В., Бубнова О. А.* Иммуногенетические показатели у работающих в условиях сочетанного воздействия пыли и производственного шума. *Российский иммунологический журнал* 2015, 9(18), 551–553. [Dolgikh O. V., Krivtsov A. V., Bubnova O. A. Immunogenetic indicators in workers occupied under exposure to dust and industrial noise. *Russian Journal of Immunology* 2015, 9(18), 551–553.]
  8. *Мусина А. А., Ерденова Г. К., Цукрова О. В.* Гигиеническая оценка факторов риска по материалам аттестации рабочих мест хромового производства. *Гигиена труда и медицинская экология* 2017, 3 (56), 51–52. [Musina A. A., Erdenova G. K., Cukrova O. V. Hygienic assessment of risk factors according to the materials of certification of workplaces chrome production. *Occupational health and medical ecology* 2017, 56(3), 51–2.]

## ASSESSMENT OF CELL-MEDIATED IMMUNITY IN WORKERS EMPLOYED IN UNDERGROUND CHROME ORE MINING

© 2019 I. N. Alikina

*E-mail: oleg@fcrisk.ru*

*FBUN Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russia*

**Received:** 24.05.2019. **Accepted:** 28.06.2019

Immunological study of the violation of cellular component of immune system in workers employed in chrome ore mining revealed excessive production of suppressor T-regulatory cells CD4<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>, apoptotic Bax protein. What is more, there was an increase in the rate of specific sensitization of IgE to chrome in relation to the comparison group associated with elevated chrome level in the blood (more than 5 times in relation to the reference level). A significant decrease in CD-immunogram parameters was found: CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>. Besides, there was reduction in expression of intracellular protein factor Bcl-2, transcription factor regulating the cell cycle – p53, receptor for tumor necrosis factor TNFR compared with the values of employees working outside the influence of the studied industrial factors (p<0.05). Thus, the production conditions associated with hapten load (chrome) create an imbalance of cellular regulation, disrupting the programmed procedure of cell death (apoptosis).

*Key words:* clusters of cell differentiation, specific sensitization, chrome

### Author:

**Alikina I. N.**, junior researcher of the laboratory of cellular diagnostic methods FBFSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”, Perm, Russia.

Perm, FBFSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”. Phone: (342) 236-39-30.

**E-mail:** oleg@fcrisk.ru

## ОПЫТ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ОСТРОГО МИЕЛОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА, РЕЗИСТЕНТНОГО К ПРОГРАММНОЙ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ, У БОЛЬНОГО МОЛОДОГО ВОЗРАСТА

© 2019 г. А. В. Виноградов<sup>1,2\*</sup>, А. В. Резайкин<sup>3</sup>, Е. А. Партылова<sup>2</sup>,  
С. В. Сазонов<sup>3</sup>, А. Г. Сергеев<sup>3</sup>

\*E-mail: a.vinogradov@egov66.ru

<sup>1</sup>Министерство здравоохранения Свердловской области, Екатеринбург, Россия;

<sup>2</sup>Государственное бюджетное учреждение Свердловской области «Свердловская областная  
клиническая больница № 1», Екатеринбург, Россия;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации, Екатеринбург, Россия

Поступила: 29.05.2019. Принята: 30.06.2019

Исследовали пробы костного мозга и периферической крови больного Л., 38 лет, проходившего программное химиотерапевтическое лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре, а впоследствии — сдерживающее химиотерапевтическое и симптоматическое лечение под контролем онколога на базе медицинской организации по месту жительства. При иммуногистохимическом исследовании трепанобиоптата подвздошной кости определялся диффузный инфильтрат из мононуклеаров среднего и мелкого размеров с чертами бластов, со светлым ядром несколько неправильной формы с одним или несколькими ядрышками, коэкспрессирующих в ядре и цитоплазме MPO и CD34, слабо и неравномерно CD117, в части клеток — CD68. Цитохимические реакции на липиды были положительны в 29,0% бластов, мелкогранулярный гликоген на диффузном фоне определялся в 81,0% бластных клеток. Иммунофенотипически бластные клетки характеризовались экспрессией CD45, CD13, CD33, CD34, CD38, CD117, MPO-сут. При цитогенетическом исследовании (G-banding) определялся аберрантный кариотип 47, XY, +13. Методом прямого секвенирования определялись несинонимичные трансверсии с. 182 A>C в протоонкогене NRAS и с. 215 C>G в антионкогене TP53. Опухоль была резистентна к программной полихимиотерапии, при этом кариотип ОМЛ изменялся со временем за счет появления дополнительных аберрантных клонов, несущих новые структурные и количественные хромосомные аномалии. Количество функционально значимых мутаций в гене NRAS также увеличилось: наряду с определявшейся в дебюте заболевания трансверсией с. 182 A>C, на 40 месяце наблюдения была выявлена дополнительная замена — с. 35 G>C. Иммунофенотипические характеристики бластных клеток при этом не изменялись. Общая продолжительность наблюдения и лечения больного составила 42 месяца.

**Ключевые слова:** острый миелобластный лейкоз, иммунофенотип, цитогенетика, прямое автоматическое секвенирование

DOI: 10.31857/S102872210007232-0

**Адрес:** Екатеринбург, Министерство здравоохранения Свердловской области, Виноградов Александр Владимирович.

Тел.: +79089093135, E-mail: a.vinogradov@egov66.ru

**Авторы:**

**Виноградов А. В.**, к.м.н., главный терапевт Министерства здравоохранения Свердловской области, Екатеринбург, Россия;

**Резайкин А. В.**, к.м.н., доцент кафедры медицинской физики, информатики и математики ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Россия;

**Партылова Е. А.**, к.м.н., старший врач клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1», Екатеринбург, Россия;

**Сазонов С. В.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Россия;

**Сергеев А. Г.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Россия.

## ВВЕДЕНИЕ

Диагностика и лечение острых миелоидных лейкозов (ОМЛ), резистентных к программной полихимиотерапии, являются одной из актуальных задач современной онкогематологии. Общеизвестной стратегией, направленной на преодоление резистентности ОМЛ, является интенсификация химиотерапии с последующей аллогенной трансплантацией костного мозга в первой ремиссии. Это неизбежно сопровождается селекцией больных, имеющих медицинские противопоказания, в т.ч. относительные, к такому лечению. Стратегии ведения больных ОМЛ вне ремиссии (например, в рамках оказания паллиативной помощи) систематически не проработаны, за исключением некоторых клинических исследований таргетных биофармацевтических препаратов, эффективность которых, как правило, недостаточна и ограничена продлением жизни пациентов на 12–18 месяцев [1–3].

**Цель работы** – выполнить анализ случая иммунологической диагностики и длительного сдерживающего лечения больного ОМЛ молодого возраста, резистентного к программной полихимиотерапии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали пробы костного мозга и периферической крови больного Л., 38 лет, проходившего программное химиотерапевтическое лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре, а впоследствии – сдерживающее химиотерапевтическое и симптоматическое лечение у районного онколога на базе медицинской организации по месту жительства. Общая продолжительность наблюдения составила 42 месяца. Диагностику ОМЛ осуществляли на основании клинической картины, цитологического анализа крови и костного мозга, цитохимического и иммунофенотипического исследования [1, 2]. Также выполнены иммуногистохимическое исследование трепанобиоптата подвздошной кости, цитогенетическое исследование (G-banding) и детекция генных мутаций в кодирующих последовательностях экзонов 18–26 гена DNMT3A, 12–15 и 19–21 гена FLT3, 7–12 и 16–19 гена KIT, 1–4 гена KRAS, 9–12 гена NPM1, 1–4 гена NRAS, 4–11 гена TP53, 6–9 гена WT1 методом прямого автоматического секвенирования. Праймеры, использовавшиеся для детекции мутаций в указанных генах, технологии выделения РНК и секвенирования кДНК описаны нами ранее [4–8].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследуемом случае заболевание манифестировало с появления лихорадки до 40°С, петехиальной сыпи на различных участках кожи в сочетании с ветряночными папулами и пустулами с геморрагическим пропитыванием (диагностирован дебют ветряной оспы), стоматита, гингивита, десневых кровотечений.

В клиническом анализе крови уровень гемоглобина составил 69 г/л, лейкоцитов –  $76,5 \times 10^3$ /мкл (бластемия – 61,0%), тромбоцитов –  $12 \times 10^3$ /мкл. В гиперклеточном костном мозге (миелокарициты – 120000/мкл) бластные клетки составляли 47,2%, базофилы – 4,6%. Цитохимические реакции на липиды были положительны в 29,0% бластов, мелкогранулярный гликоген на диффузном фоне определялся в 81,0% бластных клеток. Иммунофенотипически бластные клетки характеризовались экспрессией CD45<sup>low</sup> (63%), CD34 (63%), CD13 (62%), cytMPO (47%), CD117 (33%), CD33 (30%), CD38 (27%), HLA-DR (15%). При иммуногистохимическом исследовании определялся диффузный инфильтрат из мононуклеаров среднего и мелкого размеров с чертами бластов, со светлым ядром несколько неправильной формы с одной или несколькими ядрышками, коэкспрессирующих в ядре и цитоплазме MPO и CD34, слабо и неравномерно CD117, в части клеток – CD68. На основании данных морфологического исследования у больного был диагностирован ОМЛ, вариант M2базо по FAB-классификации. При дополнительном инструментальном обследовании выявлена умеренная гепатоспленомегалия, инфаркт селезенки, небольшое количество жидкости в левом плевральном синусе, в биохимическом анализе – повышенный уровень ЛДГ (1291 Е/л).

При цитогенетическом исследовании определялся аберрантный кариотип лейкозных бластов 47, XY, +13. ПЦР-методом химерные транскрипты BCR-ABL и CBFB2-MYH11 не определялись. Методом прямого секвенирования определялась криптокросс-трансверсия с. 182 A>C по второй позиции кодона САА в гене NRAS, приводившая к замене аминокислотного остатка глутамина на пролин в кодируемом полипептиде (р. 61 Q>P). Кроме того, в кодирующей последовательности антионкогена TP53 определялась несинонимичная трансверсия с. 215 C>G, являющаяся полиморфным аллельным вариантом, не имеющим в патогенезе лейкозов [7]. Кодирующие последовательности экзонов остальных исследованных генов полностью соответствовали «дикому типу».

Программное лечение ОМЛ проводилось по протоколу ОМЛ 01.10 Российской исследовательской группы по изучению острых лейкозов. В течение трех дней пациент получал предфазу нарастающими дозами гидроксикарбамида с 1,0 до 3,0/сут внутрь. В фазе индукции ремиссии использовался цитарабин 100 мг/м<sup>2</sup> с 1-го по 7-й день, даунорубин 60 мг/м<sup>2</sup> с 1-го по 3-й дни («7+3») [3]. В постцитостатическом периоде на +7 сутки диагностирована фебрильная нейтропения, по поводу которой пациент получал антибиотики широкого спектра действия и противогрибковые препараты. На +10 сутки после окончания курса полихимиотерапии в клиническом анализе крови сохранялась бластемия 15% при уровне лейкоцитов 2700/мкл, низкий уровень гемоглобина (88 г/л) и тромбоцитов (7×10<sup>3</sup>/мкл) на фоне заместительной трансфузионной терапии в полном объеме. Констатирована резистентность лейкозных клеток к первому курсу индукции ремиссии. На +21 сутки начат второй курс индукции ремиссии по той же схеме («7+3»), однако на +14 сутки после его окончания в аспирате костного мозга сохранялась лейкоэмическая инфильтрация (до 50% бластов), в связи с чем материал был повторно направлен на иммунофенотипическое, цитогенетическое и молекулярно-генетические исследования.

После проведенного обследования подтвержден диагноз ОМЛ, М2базо по FAB-классификации, резистентный к двум курсам химиотерапии по схеме «7+3». При этом кариотип лейкозных клеток изменился на 47, XY,+13 / 47, XY,+mar(16) / 46, XY, del(5)(p1.3-1.5) / 46, XY (Рисунок 1), но трансверсия с. 182 A>C в гене NRAS продолжала определяться как в пробах костного мозга, так и периферической крови. Для преодоления резистентности выполнен курс интенсивной химиотерапии НАМ (цитарабин 11,7/сут в 1–3 дни, митоксантрон 19,5/сут в 3–5 дни) [3]. Постцитостатический период характеризовался персистирующей панцитопенией и осложнился herpes zoster в сроки на +50 сутки после окончания курса. При исследовании аспирата костного мозга вновь сохранялась лейкоэмическая инфильтрация (недифференцированные бласты – 10,4%). Констатирована резистентность опухоли к проводимому лечению.

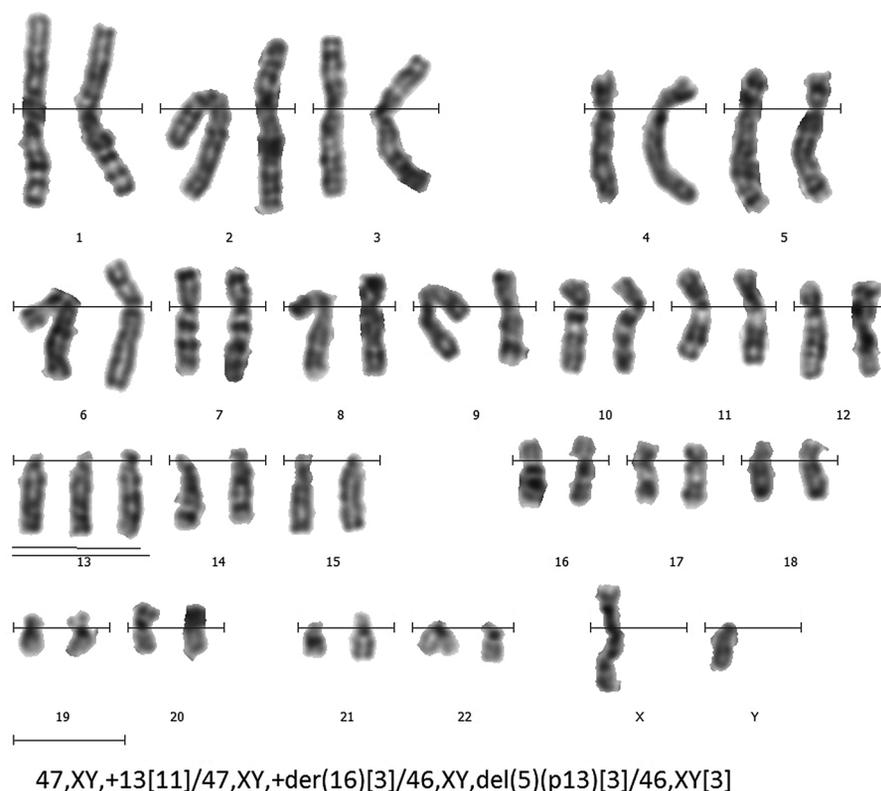
В связи с персистирующей панцитопенией больному было продолжено паллиативное лечение малыми дозами цитарабина 20 мг 2 раза в сутки подкожно, а в дальнейшем он был переведен на таблетированные препараты (6-мер-

каптопурин, гидроксикарбамид), которые получал амбулаторно под контролем онколога по месту жительства в течение трех лет. Осуществлялась заместительная трансфузионная терапия в целях коррекции анемии и тромбоцитопении. При контрольных осмотрах гематолога исследовались аспираты костного мозга. Оказалось, что на 40 месяце лечения aberrantный кариотип лейкоэмических клеток изменился на 47, XY, add(14)(q32),-10,+13,+20 [5] / 47, XY,+13 [3] / 47, XY, add(14)(q32),+13 [2] / 46, XY, add(14)(q32),-10,+13 [2]. При этом в гене NRAS, наряду с ранее определявшейся несинонимичной трансверсией с. 182 A>C, была выявлена дополнительная мутация – с.35 G>C. Смерть пациента наступила на 42 месяце наблюдения на фоне прогрессирования синдрома костномозговой недостаточности.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Диагностика и лечение резистентных к стандартной программной полихимиотерапии форм ОМЛ представляет собой достаточно серьезную проблему в клинической онкогематологии. С одной стороны, наличие неблагоприятных молекулярных и цитогенетических предикторов позволяет прогнозировать низкую эффективность ответа ОМЛ на лечение цитарабином и антрациклинами, с другой, эффективные таргетные препараты для лечения ОМЛ с комплексными генетическими аномалиями и мутациями в гене NRAS не разработаны, а потому в качестве основной лечебной опции используется аллогенная трансплантация костного мозга вне ремиссии заболевания, хотя ее эффективность невысока [9]. При наличии медицинских противопоказаний к интенсивной химиотерапии и трансплантации методом выбора является паллиативная химиотерапия [3].

В описанном наблюдении отмечалось наличие трисомии по хромосоме 13 и несинонимичной замены с. 182 A>C в гене NRAS, являвшихся факторами неблагоприятного прогноза ОМЛ, в дебюте заболевания. Лейкемические клетки были резистентными к трем курсам интенсивной полихимиотерапии. Длительная персистирующая панцитопения и тяжелые инфекционные осложнения являлись противопоказанием для дальнейшей интенсификации лечения. Тем не менее, на фоне сдерживающего лечения малыми дозами цитарабина, 6-меркаптопурином и гидроксикарбамидом, удалось стабилизировать течение заболевания. В результате, общая



**Рисунок 1.** Кариотип лейкозных клеток при ОМЛ M2 базо после окончания двух курсов программной полихимиотерапии.

продолжительность наблюдения пациента вне ремиссии составила около 3,5 лет. При этом трансверсия с. 182 A>C в гене NRAS определялась в пробах костного мозга и периферической крови как в дебюте заболевания, так и на всех последующих этапах его наблюдения и лечения. Иммунофенотипические характеристики бластных клеток не изменялись. Кариотип лейкозных клеток эволюционировал во все периоды наблюдения резистентного ОМЛ за счет появления дополнительных aberrантных клонов, несущих как новые структурные, так и количественные аномалии хромосом. Кроме того, на 40 месяце наблюдения в гене NRAS, наряду с ранее определявшейся мутацией с. 182 A>C, была выявлена еще одна функционально значимая замена – с. 35 G>C, что также являлось маркером клональной эволюции резистентного ОМЛ в терминальной стадии.

### ВЫВОДЫ

1. Мутации в гене NRAS, анеуплоидии и комплексные aberrации хромосом являлись факторами риска развития резистентности ОМЛ к программной полихимиотерапии.

2. Кариотип лейкозных клеток эволюционировал при резистентном ОМЛ за счет появления дополнительных aberrантных клонов, несущих новые структурные и количественные аномалии хромосом.

3. Количество функционально значимых мутаций в гене NRAS, определяемых методом прямого секвенирования, увеличилось в ходе эволюции резистентного ОМЛ: наряду с определявшейся в дебюте заболевания несинонимичной трансверсией с. 182 A>C, на 40 месяце наблюдения дополнительно определялась замена с. 35 G>C.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Swerdlow S. H., Campo E., Harris N. L. et al. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, IARC, 2008, 439.
2. Vardiman J. V., Thiele J., Arber D. A. et al. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009, 114 (5), 937–952.
3. Савченко В. Г., Паровичникова Е. Н., Афанасьев Б. В. и соавт. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых. *Гематология и транс-*

- физиология 2014, 59 (S.2), 2–29. [Savchenko V. G., Parovichnikova E. N., Afanasyev B. V. et al. National clinical guidelines for the diagnosis and treatment of acute myeloid leukemia in adults. Hematol. Transfusiol 2014, 59 (S.2), 2–29.]
4. **Виноградов А. В.** Разработка технологии детекции мутаций генов CDKN2A/ARF, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TET2, TP53, WT1 при острых миелоидных лейкозах. Российский онкологический журнал 2013, 4, 34–35. [Vinogradov A. V. Technology development of CDKN2A/ARF gene mutations detection, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TET2, TP53, WT1 during acute myeloid leukemia Russian Journal of Oncology 2013, 4, 34–35.]
  5. **Виноградов А. В., Резайкин А. В., Сазонов С. В., Сергеев А. Г.** Клинико-патогенетическая характеристика мутаций генов DNMT3A, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TP53 и WT1 у больных острыми миелоидными лейкозами в возрастной группе 15–45 лет. Гены и клетки 2018, 14 (3), 70–74. [Vinogradov A. V., Rezaikin A. V., Sazonov S. V., Sergeev A. G. Clinical and pathological features DNMT3A, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TP53 and WT1 genes mutations detection in acute myeloid leukemia patients aged 15–45 years old. Genes and cells 2018, 14 (3), 70–74.]
  6. **Виноградов А. В., Резайкин А. В., Сергеев А. Г.** Детекция точечных мутаций в гене DNMT3A при острых миелоидных лейкозах методом прямого автоматического секвенирования. Бюллетень сибирской медицины 2015, 14(1), 18–23. [Vinogradov A. V., Rezaikin A. V., Sergeev A. G. DNMT3A gene point mutations detection in acute myeloid leukemia patients using sequencing technique. Bulletin of Siberian Medicine 2015, 14(1), 18–23.]
  7. **Виноградов А. В., Резайкин А. В., Сергеев А. Г.** Детекция точечных мутаций генов KRAS и NRAS при острых миелоидных лейкозах с использованием технологии прямого автоматического секвенирования. Вестник Башкирского университета 2014, 3, 845–847. [Vinogradov A. V., Rezaikin A. V., Sergeev A. G. KRAS and NRAS genes point mutations detection in acute myeloid leukemia patients using sequencing technique. Bulletin of Bashkir State University 2014, 3, 845–847.]
  8. **Виноградов А. В., Резайкин А. В., Сергеев А. Г.** Прогностическое значение мутаций гена TP53 при программном лечении острых лейкозов. Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН 2013. 24(2), 33–40. [Vinogradov A. V., Rezaikin A. V., Sergeev A. G. Prognostic impact of TP53 mutations in the treatment of acute leukemia. Journal of N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS 2013. 24(2), 33–40.]
  9. **Гиндина Т. Л., Мамаев Н. Н., Николаева Е. С. и соавт.** Исход аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при острых миелоидных лейкозах с гипердиплоидным кариотипом. Клиническая онкогематология. 2016. 9(4), 383–390. [Gindina T. L., Mamayev N. N., Nikolayeva E. S. et al. Outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia with hyperdiploid karyotype. Clin. Oncohematol. 2016. 9(4), 383–390.]

## IMMUNOLOGICAL EVALUATION AND TREATMENT OF RESISTANCE ACUTE MYELOID LEUKEMIA IN YOUNG ADULT (CASE REPORT)

© 2019 A. V. Vinogradov<sup>1,2\*</sup>, A. V. Rezaykin<sup>3</sup>, E. A. Partylova<sup>2</sup>, S. V. Sazonov<sup>3</sup>, A. G. Sergeev<sup>3</sup>

\*E-mail: a.vinogradov@egov66.ru

<sup>1</sup>Sverdlovsk Regional Ministry of Health, Ekaterinburg, Russia;

<sup>2</sup>Sverdlovsk Regional State Hospital N1, Ekaterinburg, Russia;

<sup>3</sup>Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia

Received: 29.05.2019. Accepted: 30.06.2019

**Aim:** to analyze the case of immunological detection and treatment of young male with resistant acute myeloid leukemia in Sverdlovsk Regional Hematological Centre. Bone marrow and peripheral blood samples obtained from male, aged 38, treated using intensive chemotherapy programs and then obtained supportive care and palliative chemotherapy in municipal hospital. Immunohistochemical characterization of AML blast cells: medium and small cells with one or several nucleoli, MPO, CD34, CD117, CD68 positive. In cytochemistry lipids were positive in 29.0% of blasts, glycogen – 81.0%. Immunophenotype of blast cells was CD45, CD13, CD33, CD34, CD38, CD117, MPO-cyt (+). Karyotype was 47, XY, +13 and changed during AML clonal progression. In case, two non-synonymous substitution were co-existed in samples: NRAS gene c. 182 A>C and TP53 gene c. 215 C>G. The number of NRAS gene point mutations changed during AML clonal progression (additional c. 35 G>C substitution was found). Immunophenotype of blast cells not changed during progression. Overall time of patient observation was 42 week.

**Key words:** acute myeloid leukemia, immunophenotyping, cytogenetics, direct sequencing

**Authors:**

**Vinogradov A. V.**, ✉ MD, chief therapist of the Sverdlovsk Regional Ministry of Health, Ekaterinburg, Russia; Ekaterinburg, Sverdlovsk Regional Ministry of Health. Phone: +79089093135, **E-mail:** a.vinogradov@egov66.ru;

**Rezaykin A. V.**, MD, professor assistant of Department of Medical Physics, Informatics and Mathematics, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia;

**Partylova E. A.**, MD, senior physician of clinical laboratory, Sverdlovsk Regional State Hospital N1, Ekaterinburg, Russia;

**Sazonov S. V.**, MD, professor, chief of Department of Histology, Cytology and Embryology, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia;

**Sergeev A. G.**, MD, professor, chief of Department of Microbiology, Virology and Immunology, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia.

## СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СПЕРМЕ ПРИ БЕСПЛОДИИ, АССОЦИИРОВАННОМ С ХРОНИЧЕСКИМ ПРОСТАТИТОМ

© 2019 г. Э. Ф. Галимова<sup>1</sup>, О. Ю. Травников<sup>1</sup>, З. Г. Хайбуллина<sup>1</sup>,  
А. З. Муртазина<sup>2</sup>, Т. С. Асадуллина<sup>1</sup>, Ш. Н. Галимов<sup>1\*</sup>

\*E-mail: sngalim@mail.ru

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, Россия;

<sup>2</sup>Государственное казенное учреждение здравоохранения Медицинский информационно-аналитический центр Минздрава Республики Башкортостан, Уфа, Россия

Поступила: 26.05.2019. Принята: 29.06.2019

В работе дана оценка с использованием метода ИФА содержания 16 цитокинов в семенной плазме 85 пациентов с хроническим простатитом и сопутствующим бесплодием с целью определения их значимости как потенциальных маркеров прогноза и эффективности лечения. Установлено статистически значимое увеличение концентрации IFN- $\gamma$  и IL-18 на фоне существенного уменьшения уровней IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , SDF-1 $\alpha$  и IL-7. Наиболее информативным предиктором ограничения оплодотворяющей способности сперматозоидов при воспалении предстательной железы представляется нарушение баланса IL-18 и TGF- $\beta$  как ключевых регуляторов иммунного статуса репродуктивной системы.

**Ключевые слова:** бесплодие, сперма, цитокины, хронический простатит

DOI: 10.31857/S102872210007233-1

**Адрес:** Уфа, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Галимов Шамиль Нариманович. Тел.: +79174263934.

**E-mail:** sngalim@mail.ru

**Авторы:**

**Галимова Э. Ф.**, д.м.н., ведущий научный сотрудник ЦНИЛ, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, Россия;

**Травников О. Ю.**, к.х.н., доцент кафедры мобилизационной подготовки здравоохранения и медицины катастроф, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, Россия;

**Хайбуллина З. Г.**, к.б.н., доцент кафедры биологической химии, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, Россия;

**Муртазина А. З.**, к.м.н., начальник отдела, ГКУЗ Медицинский информационно-аналитический центр Минздрава Республики Башкортостан, Уфа, Россия;

**Асадуллина Т. С.**, ассистент кафедры терапии и сестринского дела, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, Россия;

**Галимов Ш. Н.**, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

В целом ряде публикаций последнего времени контекстуализируется важность продолжения исследований мужского репродуктивного

здоровья [4, 5, 7]. Одно из актуальных направлений андрологии связано с патологией предстательной железы, поскольку около трети мужчин страдает хроническим простатитом [1, 10]. Важнейшим признаком репродуктивной патологии является патоспермия, причиной которой может быть инфицирование предстательной железы. Патогенные бактерии, лейкоциты, цитокины и активные формы кислорода выступают в качестве пусковых механизмов повреждения сперматозоидов [3, 4].

Современные исследования по патогенезу простатита фокусируются на иммунологических событиях в предстательной железе [7]. Иммунный ответ при простатите начинается с активации иммунной системы инфекционными или неинфекционными стимулами, а воспалительные процессы действуют как сенсоры и эффекторы этих стимулов. Образующиеся супрамолекулярные структуры, известные как инфламмосомы, активируют каспазу-1, которая обеспечивает активацию провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-18. Ключевая роль в развитии урологической патологии принадлежит инфламмосоме NLRP3, которая рассматривается как перспек-

тивная молекулярная мишень терапевтических стратегий ограничения гиперпродукции IL-18 и функционально близких пептидов.

**Целью** настоящей работы явилось исследование цитокинового статуса мужчин с простатитом и сопутствующим бесплодием.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 85 бесплодных пациентов клиник вспомогательных репродуктивных технологий, группу сравнения составили 28 мужчин фертильного возраста, имеющих от 1 до 3 здоровых детей. Анализ эякулята проводили в соответствии с протоколом ВОЗ (2010). Образцы семенной плазмы отбирали после полного разжижения эякулята и центрифугировали при 300 г в течение 20 минут. Все пациенты были информированы о цели исследования и согласились на обработку образцов спермы. Содержание цитокинов, хемокинов и факторов роста находили иммуноферментным методом с помощью стандартных тест-систем в соответствии с прилагаемыми инструкциями производителя.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Характерными признаками фертильной спермы явились высокие уровни TGF- $\beta$ , SDF-1 $\alpha$ , IL-8 и IL-7 (медианы >1000 пг/мл) (Таблица 1). Другие цитокины были обнаружены в низкой концентрации (медианы <100 пг/мл). При бесплодии выявлены статистически значимые различия в уровнях цитокинов. Так, обнаружено существенное увеличение IFN- $\gamma$  и IL-18. Эти цитокины, особенно IFN- $\gamma$ , в норме присутствуют в эякуляте в очень низких концентрациях. Интерферон- $\gamma$  как секрет активированных Т-клеток и натуральных киллеров способен оказывать токсическое воздействие на функцию сперматозоидов. Экспрессия IFN- $\gamma$  может быть индуцирована IL-18, который продуцируется макрофагами и является важнейшим медиатором противоопухолевого иммунитета.

Повышенный уровень цитокинов в секрете простаты и эякуляте – частая находка при простатите. По данным литературы, предиктором воспаления предстательной железы является IL-8 (sIL-8) [8]. Имеются свидетельства участия sIL-8 в воспалении не только простаты, но и других органов мужского полового тракта, в частности, семенных пузырьков и эпидидимиса, но не яичек. Другой особенностью цитокинового зеркала спермоплазмы обследованных явилось

**Таблица 1.** Содержание некоторых цитокинов в спермоплазме обследованных мужчин (пг/мл,  $M \pm m$ )

Показатель	Группа	
	Контроль	Простатит
IL-1 $\beta$	4,27 $\pm$ 0,44	1,46 $\pm$ 0,34*
IL-2	5,72 $\pm$ 0,51	5,23 $\pm$ 0,48
IL-4	14,4 $\pm$ 0,88	3,5 $\pm$ 0,33*
IL-5	59,2 $\pm$ 6,0	61,3 $\pm$ 8,3
IL-6	7,73 $\pm$ 1,18	9,65 $\pm$ 1,14
IL-7	1823 $\pm$ 181	1220 $\pm$ 142*
IL-8	1228 $\pm$ 129	1902 $\pm$ 225*
IL-10	3,82 $\pm$ 0,33	4,29 $\pm$ 0,52
IL-11	86,1 $\pm$ 7,9	76,1 $\pm$ 8,3
IL-13	5,16 $\pm$ 0,52	4,2 $\pm$ 0,69
IL-17	7,29 $\pm$ 0,82	8,32 $\pm$ 1,14
IL-18	22,1 $\pm$ 3,5	132,7 $\pm$ 11,2*
TNF $\alpha$	1,67 $\pm$ 0,21	1,83 $\pm$ 0,22
SDF-1 $\alpha$	5917 $\pm$ 253	3275 $\pm$ 152*
TGF- $\beta$	86118 $\pm$ 6724	21036 $\pm$ 3489*
IFN- $\gamma$	1,21 $\pm$ 0,32	9,38 $\pm$ 0,61*

**Примечание:** \*  $p < 0,05$  по сравнению с фертильными донорами.

снижение уровней IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , SDF-1 $\alpha$  и IL-7, ключевых регуляторов межклеточных взаимодействий и иммунных процессов в репродуктивной системе [3, 10]. Содержание этих биологически активных соединений, например, IL-1 $\beta$ , тесно связано с мужской фертильностью. Отклонение от оптимального уровня этого и других перечисленных цитокинов отражает состояние иммунитета и/или наличие инфекции.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Аномально высокие уровни некоторых цитокинов, как спутники персистирующей инфекции в мужских половых путях, могут инициировать процессы перекисного окисления и негативно повлиять на оплодотворяющую способность сперматозоидов. Изменение содержания IL-18, IFN- $\gamma$  и/или IL-8 в семенной плазме может быть чувствительным предиктором инфекции/воспаления в мужском репродуктивном тракте и сигналом к началу противовоспалительного лечения [6].

Яички являются иммунопривилегированным органом из-за толерантности к секретируемым

во время полового созревания аутоантигенам зародышевых клеток. Толерантность яичек детерминирована совместным функционированием комплекса андрогенов, интерлейкинов, хемокинов, факторов роста и тестикулярных макрофагов. Установленный в настоящем исследовании выраженный дефицит TGF- $\beta$ , IL-7 и SDF-1 $\alpha$  свидетельствует о нарушении иммунного гомеостаза в гонадах.

В наибольшей степени снижался уровень TGF- $\beta$ , который в норме регулирует функцию клеток Лейдига и Сертоли, развитие яичек и гаметогенез, а в сочетании с TNF $\alpha$  индуцирует апоптоз сперматозоидов. Резкое угнетение секреции TGF- $\beta$  при бесплодии на фоне хронического простатита указывает на важную роль этого цитокина в генезе репродуктивных расстройств и является основанием для более широкого использования этого теста для прогнозирования фертилизационного потенциала.

В последнее время появились сообщения, в которых подчеркивается ограниченная ценность рутинного анализа эякулята для верификации оплодотворяющей способности мужчин [5]. Определение концентрации цитокинов по-прежнему не является обычной практикой. Для ответа на вопрос о будущем новых биомаркеров, таких как цитокины семенной плазмы, требуется выполнение контролируемых проспективных исследований с большим количеством пациентов в различных клиниках, широким спектром анализируемых параметров спермы, включая родственные цитокинам соединения, с обязательной оценкой вероятности зачатия и исхода беременности [8, 9].

## ВЫВОДЫ

1. Установлены значительные изменения в микропаттерне цитокинов спермы пациентов с хроническим простатитом на фоне бесплодия.

2. Спектр лабораторных исследований при этой патологии необходимо дополнить определением в сперме IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-7, TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$  и SDF-1 $\alpha$  для уточнения их реальной

диагностической значимости в клинической практике.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Божедомов В. А.* Хронический простатит: новая парадигма лечения // Урология. 2016, S3, 78–90. [*Bozhedomov V. A.* Chronic prostatitis: a new paradigm of treatment. *Urologiia*. 2016, S3, 78–90.]
2. *Галимов Ш. Н., Галимова Э. Ф., Павлов В. Н.* Цитокиновый спектр сыворотки крови и спермоплазмы при идиопатическом бесплодии. Пермский мед. журн. 2012, 6, 58–63. [*Galimov Sh. N., Galimova E. F., Pavlov V. N.* Blood serum and spermoplasma cytokine spectrum in idiopathic sterility. *Perm Medical Journal*. 2012, 6, 58–63.]
3. *Павлов В. Н., Галимова Э. Ф., Ахмадуллина Г. Х., Галимов Ш. Н.* Медико-биологические, социальные и культурно-образовательные аспекты охраны мужского здоровья. Профилактическая и клиническая медицина. 2014, 2, 5–13. [*Pavlov V. N., Galimova E. F., Akhmadullina G. Kh., Galimov Sh. N.* Medical-biological, social, educational and cultural aspects of man health. *Preventive and clinical medicine*. 2014, 2, 5–13.]
4. *Condorelli R., Russo G., Calogero A., Morgia G., La Vignera S.* Chronic prostatitis and its detrimental impact on sperm parameters: a systematic review and meta-analysis. *J. Endocrinol. Invest.* 2017, 40 (11), 1209–1218.
5. *Esteves S., Agarwal A., Roque M., Humaidan P.* Hot topics in male infertility: an afterword. *Panminerva Medica*. 2019, 61 (2), 101–103.
6. *Fijak M., Pilatz A., Hedger M., Nicolas N., Bhushan S., Michel V., Tung K., Schuppe H., Meinhardt A.* Infectious, inflammatory and ‘autoimmune’ male factor infertility: how do rodent models inform clinical practice? *Hum. Reprod. Update*. 2018, 24 (4), 416–441.
7. *Ho D.* Prostate inflammation: A brief review. *Urological Sci.* 2017, 28 (3), 113–118.
8. *Johnson M., Dasgupta T., Gopichandran N., Field S., Orsi N.* A Bayesian view of murine seminal cytokine networks. *PLoS One*. 2017, 12 (11), e0188897.
9. *Samanta L., Parida R., Dias T., Agarwal A.* The enigmatic seminal plasma: a proteomics insight from ejaculation to fertilization. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2018, 16, 41.
10. *Schuppe H., Pilatz A., Hossain H., Diemer T., Wagenlehner F., Weidner W.* Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2017, 114 (19), 339–346.

## THE CONTENTS OF CYTOKINES IN SEMEN IN INFERTILITY ASSOCIATED WITH CHRONIC PROSTATITIS

© 2019 E. F. Galimova<sup>1</sup>, O. Yu. Travnikov<sup>1</sup>, Z. G. Khaibullina<sup>1</sup>, A. Z. Murtazina<sup>2</sup>,  
T. S. Asadullina<sup>1</sup>, Sh. N. Galimov<sup>1\*</sup>

\*E-mail: sngalim@mail.ru

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Bashkir State Medical University"  
of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Ufa, Russia;

<sup>2</sup>State public health institution Medical Information and Analytical Center of the Ministry  
of Health of the Republic of Bashkortostan, Ufa, Russia

Received: 26.05.2019. Accepted: 29.06.2019

The study assessed using the ELISA method the content of 16 cytokines in seminal plasma of 85 patients with chronic prostatitis and concomitant infertility in order to determine their significance as potential markers of prognosis and treatment efficacy. A statistically significant increase in the concentration of IFN- $\gamma$  and IL-18 was established against the background of a significant decrease in the levels of IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , SDF-1 $\alpha$  and IL-7. The most informative predictor of the limitation of the fertilizing ability of spermatozoa in inflammation of the prostate gland is the imbalance of IL-18 and TGF- $\beta$  as key regulators of the immune status of the reproductive system.

*Key words:* infertility, sperm, cytokines, chronic prostatitis

### Authors:

**Galimova E. F.**, MD, Leading Researcher of the Central Research Laboratory, Federal State Educational Institution of Higher Medical Education "Bashkir State Medical University", Ufa, Russia;

**Travnikov O. Y.**, Ph.D., Associate Professor, Department of Mobilization Preparation of Public Health and Disaster Medicine, Federal State Educational Institution of Higher Medical Education "Bashkir State Medical University", Ufa, Russia;

**Khaibullina Z. G.**, Ph.D., Associate Professor of the Department of Biological Chemistry, Federal State Educational Institution of Higher Medical Education "Bashkir State Medical University", Ufa, Russia;

**Murtazina A. Z.**, PhD, Head of Department, State public health institution Medical Information and Analytical Center of the Ministry of Health of the Republic of Bashkortostan, Ufa, Russia;

**Asadullina T. S.**, Assistant, Department of Therapy and Nursing, Federal State Educational Institution of Higher Medical Education "Bashkir State Medical University", Ufa, Russia;

**Galimov S. N.**, ✉ MD, Professor, Head of the Department of Biological Chemistry, Federal State Educational Institution of Higher Medical Education "Bashkir State Medical University", Ufa, Russia.

Ufa, FSBEI of HE "Bashkir State Medical University" of the Ministry of Health of Russia. Phone: +79174263934;

**E-mail:** sngalim@mail.ru

## ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ ИЗ РЯДА ЗАМЕЩЕННЫХ 1,3,4-6Н-ТИАДИАЗИНОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

© 2019 г. И. Ф. Гетте<sup>1,2\*</sup>, В. В. Емельянов<sup>1</sup>, А. В. Белоусова<sup>1,2</sup>,  
И. Г. Данилова<sup>1,2</sup>, Л. П. Сидорова<sup>1</sup>, Т. А. Цейтлер<sup>1</sup>

\*E-mail: i.goette@yandex.ru

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

<sup>2</sup>ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

Поступила: 26.05.2019. Принята: 29.06.2019

Проведено исследование влияния соединения L-17 из ряда замещенных 1,3,4-6Н-тиадиазинов, на цитокиновый спектр плазмы крови крыс при моделировании сахарного диабета 2 типа. Были использованы дозы никотинамида и стрептозотоцина соответственно 110 мг/кг и 65 мг/кг. Введение L-17 диабетическим крысам сопровождалось уменьшением гипергликемии и частичной коррекцией дисбаланса в содержании провоспалительных и противовоспалительных цитокинов: снижением уровня IL-1 $\alpha$  и IFN- $\gamma$  без нормализации уровня IL-10 и TGF- $\beta$ 1.

**Ключевые слова:** цитокины, сахарный диабет 2 типа, 1,3,4-6Н-тиадиазины

DOI: 10.31857/S102872210007234-2

**Адрес:** 620049, Свердловская область, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106, ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, лаборатория морфологии и биохимии, Гетте Ирина Федоровна. Тел./факс: +7(343)3740070.

**E-mail:** i.goette@yandex.ru

**Авторы:**

**Гетте И. Ф.**, к.б.н., старший научный сотрудник ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия; старший научный сотрудник кафедры иммунохимии Химико-технологического института ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

**Емельянов В. В.**, к.м.н., доцент кафедры иммунохимии, доцент кафедры медицинской биохимии и биофизики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

**Белоусова А. В.**, младший научный сотрудник ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия; лаборант-исследователь кафедры иммунохимии, ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

**Данилова И. Г.**, д.б.н., доцент, зав. лабораторией морфологии и биохимии ИИФ УрО РАН, Екатеринбург, Россия; зав. кафедрой медицинской биохимии и биофизики «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

**Сидорова Л. П.**, к.х.н., доцент кафедры безопасности жизнедеятельности ФГАОУ ВО «Уральский федеральный уни-

верситет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

**Цейтлер Т. А.**, к.х.н., м.н.с. кафедры органической и биомолекулярной химии ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Возрастающая пандемическая распространенность сахарного диабета в современном мире, обусловленная, прежде всего, ростом заболеваемости сахарным диабетом второго типа (СД 2) [1], диктует необходимость поиска новых противодиабетических средств. В патогенезе диабета как 1, так и 2 типов имеет место дисбаланс в продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [2]. Так, у пациентов с СД 2 содержание TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  было повышено, тогда как уровень IL-10 снижен [3]. Семейство IL-1 играет центральную роль в регуляции иммунных и воспалительных реакций, индуцирует высвобождение множества вторичных медиаторов воспаления, включая простагландины, цитокины и хемокины, в том числе

при СД 2 [4]. Отмечают роль IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$  при таком хроническом осложнении СД 2, как ретинопатия [5]. Установлено, что повышение уровня TNF $\alpha$  сопровождается уменьшением синтеза инсулиновых рецепторов и снижением чувствительности инсулинзависимых тканей к инсулину. Цитокины TNF $\alpha$  и IL-6 способны связываться с инсулиновыми рецепторами, нарушая сигнальные пути инсулина, что также вносит вклад в развитие инсулинорезистентности [6]. Исследования в клинике и эксперименте показали, что увеличение содержания TNF- $\alpha$  в плазме крови пациентов с сахарным диабетом 1 и 2 типа и экспериментальных животных с аллоксановым и стрептозотоциновым диабетом коррелирует с уровнем гипергликемии [6, 7].

У пациентов с СД 2 обнаружено увеличение уровня IFN- $\gamma$  [8]. IFN $\gamma$  наряду с другими провоспалительными цитокинами (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) участвует в апоптозе  $\beta$ -клеток островков поджелудочной железы [2] и формировании диабетической нефропатии [9].

Интерлейкин-10 является противовоспалительным цитокином. К эффектам IL-10 относятся: подавление синтеза провоспалительных цитокинов (FNO $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ ), презентация антигенов и активация CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Снижение секреции IL-10 связано с ожирением, метаболическим синдромом и СД 2 [10]. Предполагается, что IL-10 играет защитную роль при СД 2.

Семейство трансформирующих ростовых факторов бета (TGF- $\beta$ ) контролирует пролиферацию, клеточную дифференцировку и другие функции в большинстве клеток. Регулируя пролиферацию и дифференцировку клеток, TGF- $\beta$  может способствовать регенерации  $\beta$ -клеток. В то же время известно участие этого цитокина в формировании фиброза миокарда [11] и нефропатии [12] у пациентов с СД 2.

Длительная гипергликемия сопровождается повсеместным накоплением гликированных белков, в отношении которых также осуществляются аутоиммунные реакции, сопровождающиеся системным воспалительным процессом, что приводит к ряду хронических осложнений, таких, как микроангиопатии, нефропатия, ретинопатия [7]. Таким образом, хроническое воспаление и дисбаланс между про- и противовоспалительными цитокинами могут быть триггерами повреждения  $\beta$ -клеток и инсулинорезистентности при СД 2, а также могут усиливаться по мере прогрессирования заболевания. Снижение выраженности воспалительного процесса, в том

числе при действии антиоксидантов, представляет собою перспективный подход к лечению инсулинорезистентности у больных СД 2 [8].

В наших предыдущих исследованиях показана возможность совместной коррекции гипергликемии, неферментативного гликирования белков и оксидативного стресса при экспериментальном сахарном диабете соединением L-17 из ряда замещенных 1,3,4-6H-тиадиазинов [13]. Также при моделировании сахарного диабета 1 типа введением аллоксана нами было выявлено снижение содержания провоспалительных цитокинов при действии соединения L-17 [14]. Однако влияние замещенных 1,3,4-6H-тиадиазинов на биохимические механизмы патогенеза и цитокиновый профиль при экспериментальном СД 2 не исследовано.

**Цель исследования** – оценить возможность коррекции показателей нарушенного метаболизма и уровня цитокинов плазмы крови крыс со стрептозотоцин-никотинамидной моделью сахарного диабета 2 типа при действии соединения L-17 из ряда замещенных 1,3,4-6H-тиадиазинов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на базе Института иммунологии и физиологии УрО РАН (г. Екатеринбург). Эксперимент на животных был выполнен в соответствии с принципами Директивы 2010/63/ЕС Европейского парламента и Европейского Совета (Официальный журнал Европейского союза, 2010 г.). Животные содержались в равных условиях (12 часов света / 12 часов темноты), по 5 крыс в клетке, получали стандартный корм. Было использовано 30 крыс-самцов линии Wistar в возрасте 12 недель весом 220–250 г. Сформировано 3 группы животных по 10 крыс: 1 – интактная, 2 – СД 2, 3 – СД 2 и инъекции соединения L-17.

Для создания модели СД 2 внутрибрюшинно вводили раствор никотинамида в воде (“Sigma”, США) 110 мг/кг, через 15 минут также внутрибрюшинно вводили раствор стрептозотоцина (“Sigma”, США) в цитратном буфере 65 мг/кг [15]. Животным группы 3 после моделирования СД 2 осуществляли внутримышечные инъекции раствора соединения L-17 в новокаине из расчета 40 мг/кг, 12 инъекций в течение месяца. Животных всех групп выводили из эксперимента на 30-е сутки посредством внутримышечного введения пентобарбитала натрия 40 мг/кг. В плазме крови крыс определяли содержание

глюкозы глюкозооксидазным методом (Витал Диагностикс, СПб), в цельной крови – содержание гликированного гемоглобина методом аффинной гель-хроматографии с использованием набора реактивов ГЛИКОГЕМОТЕСТ (ЭЛТА, Москва). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре DU-800 (Beckman, США). Методом ИФА в плазме крови определяли содержание цитокинов (наборы «ThermoFisher», США) с использованием прибора LAZURITE AUTOMATED ELISA SYSTEM.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программ Statistica 6.0 (Stat. Soft. Inc.) и программы Microsoft Excel 2003. При проверке статистических гипотез использовался уровень значимости 5% ( $p < 0,05$ ). Данные представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее,  $m$  – ошибка среднего.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Моделирование СД 2 способствовало увеличению содержания глюкозы в плазме крови крыс почти в 2 раза по сравнению с показателем интактной группы. Гипергликемия в группе 2 сопровождалась накоплением гликированного гемоглобина (Таблица 1). В группе крыс 3 с моделированием СД 2 и введением соединения L-17 выявлено достоверное снижение содержания глюкозы и нормализация уровня гликированного гемоглобина относительно соответствующих показателей крыс контрольной группы 2 (Таблица 1).

В плазме крови крыс группы СД 2 было обнаружено небольшое, но статистически значимое увеличение содержания провоспалительного цитокина IL-1 $\alpha$  и значительное (почти в 7 раз) увеличение IFN- $\gamma$  относительно показателей

интактной группы, в то же время содержание TNF- $\alpha$  после моделирования СД 2 не превышало норму (Таблица 1). Уровень противовоспалительных цитокинов TGF- $\beta$ 1 и IL-10 у диабетических крыс был ниже, чем соответствующие показатели интактных животных, особенно существенным было уменьшение IL-10, почти в 7 раз относительно нормы.

После инъекций L-17 наблюдали снижение содержания IL-1 $\alpha$  и IFN- $\gamma$  по сравнению с показателями диабетических крыс. Уровень TNF- $\alpha$  у диабетических леченых и нелеченых крыс достоверно не отличался от показателя интактных животных. Содержание противовоспалительных цитокинов в группе 3 после действия L-17 не увеличилось по сравнению с показателем диабетических крыс.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты эксперимента свидетельствуют о способности соединения L-17 снижать гипергликемию. Аналогичный эффект данного соединения на модели аллоксанового диабета был связан с увеличением концентрации инсулина и влиянием на клеточность островков Лангерганса поджелудочной железы [13].

Увеличение содержания провоспалительных цитокинов IL-1 $\alpha$  и IFN- $\gamma$  в плазме крови крыс группы 2 указывает на наличие воспалительного процесса, не прекращающегося через месяц после моделирования СД 2. Отсутствие повышенного количества TNF- $\alpha$  в плазме крови диабетических крыс может быть связано с особенностью стрептозотоцин-никотинамидной модели СД 2, не предполагающей развития ожирения. Известно, что адипоциты при ожирении вносят значительный вклад в продукцию

Таблица 1. Показатели в крови экспериментальных животных

Показатель	Интактная группа	СД2	СД+ L17
Глюкоза, ммоль/л	5,1 $\pm$ 0,2	12,1 $\pm$ 1,0*	8,8 $\pm$ 0,7* <sup>2</sup>
HbA1c, %	4,3 $\pm$ 0,3	6,6 $\pm$ 0,5*	5,5 $\pm$ 0,5
IL-1 $\alpha$ , пг/мл	300,4 $\pm$ 8,4	335,0 $\pm$ 10,2*	315,1 $\pm$ 16,5
TNF- $\alpha$ , пг/мл	51,1 $\pm$ 1,5	50,7 $\pm$ 5,7	48,6 $\pm$ 3,6
IFN- $\gamma$ , пг/мл	133,5 $\pm$ 12,1	923,1 $\pm$ 177,2*	72,2 $\pm$ 19,0* <sup>2</sup>
TGF- $\beta$ 1, пг/мл	234,9 $\pm$ 14,6	144,8 $\pm$ 18,4*	111,5 $\pm$ 5,2*
IL-10, пг/мл	7262,5 $\pm$ 220,5	1058,7 $\pm$ 263,0*	688,2 $\pm$ 99,0*

Примечание: \* – различия с показателем группы интактных животных достоверны при  $P < 0,05$ ; <sup>2</sup> – различия с показателем группы СД2 достоверны при  $P < 0,05$ .

TNF- $\alpha$  и формирование инсулинорезистентности [1, 6, 7].

Коррекция уровня провоспалительных цитокинов после введения соединения L-17 диабетическим крысам свидетельствует о снижении выраженности воспалительного процесса. В механизмах этого явления могут иметь значение как выявленное ранее антиоксидантное действие соединения L-17 [13], так и воздействие на макрофаги. Отсутствие увеличения концентрации противовоспалительного цитокина IL-10 у диабетических крыс после воздействия L-17 свидетельствует о недостаточно полной коррекции системного воспалительного ответа. В сочетании со снижением уровня TGF- $\beta$ 1 это может приводить к недостаточности регенераторного процесса в панкреатических островках, что требует дальнейших исследований. Однако уменьшение содержания провоспалительных цитокинов после действия L-17 способствует частичной коррекции дисбаланса провоспалительных-антивоспалительных цитокинов.

## ВЫВОДЫ

1. Соединение L-17 из ряда замещенных 1,3,4-6H-тиадиазинов приводит к статистически значимому снижению уровня гипергликемии и гликированного гемоглобина у крыс со стрептозотоцин-никотинамидной моделью сахарного диабета 2 типа.

2. В результате введения соединения L-17 диабетическим крысам в плазме крови снижается количество провоспалительных цитокинов IL-1 $\alpha$  и IFN- $\gamma$  и антивоспалительного цитокина IL-10, что свидетельствует об уменьшении воспалительного ответа.

3. Содержание антивоспалительных цитокинов у диабетических крыс после действия L-17 не нормализуется, но уменьшение количества провоспалительных цитокинов частично корректирует дисбаланс.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 15-16-00039 П

Работа выполнена по теме Плана НИР ИИФ УрО РАН, № гос. регистрации АААА-А18-118020590107-0

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Kazemian P., Wexler D.J., Fields N.F., Parker R.A., Zheng A., Walensky R.P. Development and validation of PREDICT-DM: A new microsimulation model to project and evaluate complications and treatments of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Technol. Ther.* 2019, 21(6), 344–355.
2. Cieslak M., Wojtczak A., Cieslak M. Role of pro-inflammatory cytokines of pancreatic islets and prospects of elaboration of new methods for the diabetes treatment. *Acta Biochim. Pol.* 2015, 62(1), 15–21.
3. Tong H. V., Luu N. K., Son H. A., Hoan N. V., Hung T. T., Velavan T. P., Toan N. L. Adiponectin and pro-inflammatory cytokines are modulated in Vietnamese patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Diabetes Investig.* 2017, 8(3), 295–305.
4. Banerjee M., Saxena M. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 diabetes. *Clin. Chim. Acta.* 2012, 413(15–16), 1163–70.
5. Reverter J. L., Nadal J., Ballester J., Ramió-Lluch L., Rivera M. M., Fernández-Novell J. M., Elizalde J., Abengoechea S., Rodríguez J. E. Diabetic retinopathy is associated with decreased tyrosine nitrosylation of vitreous interleukins IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-7. *Ophthalmic Res.* 2011, 46(4), 169–74.
6. Беспалова И. Д., Рязанцева Н. В., Калюжин В. В., Афанасьева Д. С., Мурашев Б. Ю., Осихов И. А. Системное воспаление в патогенезе метаболического синдрома и ассоциированных с ним заболеваний // Сибирский медицинский журнал. 2013, № 2, 5–9. [Bespalova I. D., Ryazanceva N. V., Kalyuzhin V. V., Afanas'eva D. S., Murashev B. Yu., Osikhov I. A. Systemic inflammation in the pathogenesis of metabolic syndrome and associated diseases // Siberian Medical Journal. 2013, № 2, 5–9].
7. Осложнения сахарного диабета: лечение и профилактика. Под ред. И. И. Дедова, М. В. Шестаковой. М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство». 2017, 744 с. [Complications of diabetes: treatment and prevention. Ed. I. I. Dedov, M. V. Shestakova. M.: LLC Publisher "Medical Information Agency" 2017, 744 p.]
8. Telikani Z., Sheikh V., Zamani A., Borzouei S., Salehi I., Amirzargar M. A., Alahgholi-Hajibehzad M. Effects of sitagliptin and vitamin D3 on T helper cell transcription factors and cytokine production in clinical subgroups of type 2 diabetes mellitus: highlights upregulation of FOXP3 and IL-37. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2019, 41(2), 299–311.
9. Nosratabadi R., Arababadi M. K., Hassanshahi G., Yaghini N., Pooladvand V., Shamsizadeh A., Zarandi E. R., Hakimi H. Evaluation of IFN-gamma serum level in nephropathic type 2 diabetic patients. *Pak. J. Biol. Sci.* 2009, 12(9), 746–9.
10. Canecki-Varzic S., Prpic-Krizevac I., Mihaljevic S., Bilic-Curcic I., Alkhamis T., Wagner J., Skrlec I., Barbic J. Association between interleukin-10 gene (–1082g/A) polymorphism and type 2 diabetes, diabetes-related traits, and microvascular complications in the Croatian population. *Ophthalmic Res.* 2011, 46(4), 169–74.
11. Yue Y., Meng K., Pu Y., Zhang X. Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) mediates cardiac fibrosis and induces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2017, 133, 124–130.
12. Zhang Y., Wang B., Guo F., Li Z., Qin G. Involvement of the TGF $\beta$ 1-ILK-Akt signaling pathway in the effects of hesperidin in type 2 diabetic nephropathy. *Biomed. Pharmacother.* 2018, 105, 766–772.

13. *Emelianov V. V., Savateeva E. A., Sidorova L. P., Tseitler T. A., Maksimova N. E., Mochulskaya N. N., Chupakhin O. N., Chereshnev V. A., Gette I. F., Bulavintseva T. S. & Smirnykh S. E.* 2-Morpholino-5-Phenyl-6H-1,3,4-Thiadiazine corrects metabolic disorders during the development of alloxan diabetes mellitus in rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016, V. 162, № 1, 35–37.
14. *Danilova I. G., Emelianov V. V., Gette I. F., Medvedeva S. Yu., Bulavintseva T. S., Chereshneva M. V., Sidorova L. P., Chereshnev V. A., Sokolova K. V.* Cytokine regulation of regenerative processes in pancreatic gland in alloxan-induced diabetic rats, and its correction by 1,3,4-Thiadiazine composition and lipoic acid. *Medical Immunology (Russia)*. 2018, V. 20, Issue 1, 35–44.
15. *Спасов А. А., Воронкова М. П., Снигур Г. Л., Чепляева Н. И., Чепурнова М. В.* Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 // *Биомедицина*. 2011, № 3, 12–18. [*Spasov A. A., Voronkova M. P., Snigur G. L., Cheplyaeva N. I., Chepurnova M. V.* Experimental model of type 2 diabetes mellitus // *Bio-medicine*. 2011, № 3, 12–18.]

## THE INFLUENCE OF A NUMBER OF SUBSTITUTED 1,3,4-6H-THIADIAZINES ON THE CONTENT OF CYTOKINES IN BLOOD PLASMA OF RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS TYPE 2

© 2019 I. F. Gette<sup>1,2\*</sup>, V. V. Emelianov<sup>1</sup>, A. V. Belousova<sup>1,2</sup>, I. G. Danilova<sup>1,2</sup>, L. P. Sidorova<sup>1</sup>, T. A. Tseitler<sup>1</sup>

\*E-mail: i.goette@yandex.ru

<sup>1</sup>Ural Federal University named after the first president of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia;

<sup>2</sup>Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia

Received: 26.05.2019. Accepted: 29.06.2019

A study was carried out to investigate the impact of the L-17, a representative of 1,3,4-6H-thiadiazines, on the cytokine spectrum of rat blood plasma when simulating type 2 diabetes mellitus. Doses of nicotinamide and streptozotocin were respectively, 110 mg / kg and 65 mg / kg. The introduction of L-17 to diabetic rats was accompanied by a decrease in hyperglycemia and a partial correction of the imbalance in the content of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines: a decrease in the level of IL-1 $\alpha$  and IFN- $\gamma$  without normalization of the IL-10 and TGF- $\beta$ 1 level.

*Key words:* cytokines, type 2 diabetes, 1,3,4-6H-thiadiazines

### Authors:

**Gette I. F.**, ☒ PhD, Senior Researcher, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; Senior Researcher, Department of Immunochemistry, Institute of Chemical Technology, Ural Federal University named after the first president of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia;

620049, Sverdlovsk Region, Yekaterinburg, st. Pervomaiskaya 106, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Laboratory of Morphology and Biochemistry. Tel./fax: +7 (343) 3740070. E-mail: i.goette@yandex.ru;

**Emelianov V. V.**, PhD, Associate Professor, Department of Immunochemistry, Associate Professor, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia;

**Belousova A. V.**, Junior Researcher, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia; Laboratory Researcher, Department of Immunochemistry, Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia;

**Danilova I. G.**, Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Head of Laboratory of Morphology and Biochemistry IIF UB RAS, Head of the Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Ural Federal University named after the first president of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia;

**Sidorova L. P.**, Ph.D., Department of Life Safety, Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia;

**Tseitler T. A.**, Ph.D., Associate Professor of the Department of Organic and Biomolecular Chemistry, Ural Federal University named after the first president of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia.

## БАКТЕРИЦИДНЫЕ ЭФФЕКТЫ МОНОХРОМАТИЧЕСКОГО СВЕТА 635 НМ И 450 НМ, В ОТНОШЕНИИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* У ПАЦИЕНТОВ СО СТАФИЛОДЕРМИЯМИ

© 2019 г. О. А. Гизингер<sup>1\*</sup>, О. Р. Зиганшин<sup>1,2</sup>, А. О. Лакницкая<sup>2</sup>

\*E-mail: OGizinger@gmail.com

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Челябинск, Россия;

<sup>1,2</sup>Областной кожно-венерологический диспансер, Челябинск, Россия

Поступила: 26.05.2019. Принята: 30.06.2019

В работе приведены результаты исследования антибактериальных свойств монохроматического некогерентного света с длинами волны 635 нм средней мощностью 50 мВт, плотностью 5 Дж/см<sup>2</sup> и 450 нм средней мощностью 50 мВт, плотностью энергии 5 Дж/см<sup>2</sup>, площадью освещенной зоны – 9,25 см<sup>2</sup>, освещенность – 11 мВт/см<sup>2</sup> в условиях *in vitro* с использованием штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных с поверхности кожи пациентов со стафилодермиями, время воздействия на изоляты микроорганизмов – 900 секунд, площадь освещенной зоны – 9,25 см<sup>2</sup>, освещенность – 11 мВт/см<sup>2</sup>. Установлено, что свет с длиной волны 635±10 нм обладает слабо выраженными бактериостатическими эффектами в отношении *Staphylococcus aureus*, что подтверждалось ростом *Staphylococcus aureus* в изолятах после облучения, свет с длиной волны 450±10 нм, обладает бактериостатическими свойствами, что подтверждалось снижением числа колоний *Staphylococcus aureus* после воздействия светом с длиной волны 450±10 нм.

**Ключевые слова:** монохроматический свет, *S. aureus*, стафилодермии

DOI: 10.31857/S102872210007235-3

**Адрес:** Челябинск, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Гизингер Оксана Анатольевна. Тел.: +7919 319 46 04 (моб.).

**E-mail:** OGizinger@gmail.com

**Авторы:**

**Гизингер О. А.**, д.б.н., профессор, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Челябинск, Россия;

**Зиганшин О. Р.**, д.м.н., профессор, профессор кафедры дерматовенерологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Челябинск, Россия; главный врач областного кожно-венерологического диспансера, Челябинск, Россия;

**Лакницкая А. О.**, врач-дерматовенеролог областного кожно-венерологического диспансера, Челябинск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Эволюция представлений о роли и взаимоотношениях в системе «*S. aureus*-макроорганизм» и общих принципах лечения стафилококковых инфекций позволило разработать принципы

системной и локальной антибиотикотерапии, лечения с использованием иммуномодулирующих препаратов, чем существенно улучшило клинические результаты терапии и снизило риск осложнений. Сравнительно недавно в качестве ключевых факторов в патогенезе стафилококковых поражений кожи стали рассматривать снижение синтеза антимикробных пептидов: кателицидина (LL-37) и β-дефензинов (hBD-1, hBD-2 и hBD-3), которые являются химической составляющей эпидермального врожденного барьера [1]. Недостаточная выработка антимикробных пептидов у больных со стафилодермиями увеличивает контаминацию кожи *Staphylococcus aureus* в геометрической прогрессии при аллергическом воспалении в пораженных участках кожи. Широкая распространенность и неуклонный рост дерматозов, вызванных стафилококками, увеличение частоты тяжелых форм заболевания требуют совершенствования существующих методов терапии, актуальным является поиск новых методов, обладающих

высокой терапевтической активностью и минимальным риском развития местных и системных побочных явлений [2]. Методом патогенетической терапии может быть топическое использование некогерентного монохроматического света оптического диапазона. Рассматривая возможность использования и клиническую эффективность каждого *de novo* предлагаемого физиотерапевтического метода необходимо с особой тщательностью оценивать его прямое влияние на патоген, вызвавший заболевание. Дискутабельным остается вопрос по позиции «эффективность-длина волны монохроматического света». Ранее проведенные исследования в целом свидетельствуют о бактерицидных и бактериостатических эффектах синего света, хотя встречаются работы, рассматривающие микробиологическую эффективность синего света [3]. Длина волны может быть лимитирующим бактерицидным фактором для патогенных микроорганизмов, поскольку первичная фотореакция бактериальной клетки связана с акцепцией квантов света фоточувствительными молекулами (хромофорами) определенного биологического объекта [4]. Действие света с длиной волны 635 нм способствует санации организма от патогенов путем нормализации функционирования факторов антимикробной защиты, т.е. опосредовано через активацию системы микроциркуляции и повышению функционально-метаболического статуса клеточных, восстановлению концентрации гуморальных факторов иммунитета, снижению активности воспалительной реакции и усилению лимфоидно-плазмочитарно-клеточной кооперации [5].

**Целью** настоящего исследования явилось изучение антибактериальных эффектов видимого света с длинами волн  $635 \pm 10$  нм и  $450 \pm 10$  нм, в условиях *in vitro* с использованием *S. aureus*, выделенного с поверхности кожи пациентов со стафилодермией.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на базе клинко-диагностической лаборатории областного кожно-венерологического диспансера (г. Челябинск).

С целью выявления носительства стафилококка был проведен забор отделяемого с поверхности кожи конечностей у 30 пациентов (15 мужчин и 15 женщин) в возрасте  $41,8 \pm 5,7$  лет. Длительность заболевания варьировала от двух месяцев до года. Бактериологическое обследование кожных покровов включало: посев от-

деляемого с поврежденной кожи, взятого стерильным тампоном, на желточно-солевой агар, количественную оценку роста по числу выросших колоний, определение гемолитической активности на 5% кровяном агаре, определение лецитиназной активности на молочно-солевом, желточно-солевом агарах и постановку реакции плазмокоагуляции с кроличьей плазмой. Определение чувствительности выделенных культур к антибиотикам проводили дискодиффузионным методом. С целью изучения бактерицидных свойств монохроматического некогерентного света с длинами волн 635 нм и 450 нм в условиях *in vitro* были проведены исследования на модели коагулазоположительного *S. aureus*, обнаруженным у 30 (100%) обследуемых. Первым этапом было выделение чистой культуры *S. aureus* с последующей идентификацией чистой культуры по биохимическим свойствам. В день проведения эксперимента готовили экспериментальную систему, состоящую из 3 рядов пробирок по 4 пробирки в каждом (всего 12 пробирок) с 0,9 мл взвеси на физиологическом растворе, выделенной чистой суточной культуры коагулазоположительного штамма *S. aureus*, в концентрациях  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  КОЕ/мл, полученной от пациентов, включенных в исследование. На изоляты чистой культуры *S. aureus*, выделенных с поверхности кожи, действовали светом с длиной волн  $635 \pm 10$  нм (первый ряд пробирок), средней мощностью 50 мВт, плотностью 5 Дж/см<sup>2</sup> или светом  $450 \pm 10$  нм, средней мощностью 50 мВт, плотностью энергии 5 Дж/см<sup>2</sup>. (второй ряд пробирок) с использованием светодиодных излучающих головок, аппарат «Мустанг», Россия, (Регистрационное удостоверение № РЗН 2015/2687 от 25.05.2015, № РЗН 2014/1410 от 06.02.2014, № ФСР 2007/00589 от 24.10.2007), время воздействия на взвесь *S. aureus* в физиологическом растворе — 900 секунд. Контрольные образцы (третий ряд пробирок) инкубировали без светодиодного облучения. Расстояние между светодиодом и пробиркой было постоянным, чтобы поддерживать правильную плотность мощности. Светодиодный источник располагался на расстоянии 50 мм непосредственно от центра пробирки. Установленный светодиодный модуль имел параметры: постоянный ток (0–9 А и 0–30 В). Ток был установлен на уровне  $2,0 \pm 0,05$  А при напряжении  $5,0 \pm 0,1$  В, что давало интенсивность излучения 6 мВт/см<sup>2</sup> в течение 1 часа в пробирке. Световое поле для облучения микроорганизмов в пробирках кон-

фигурировали таким образом, чтобы в любой точке воздействия света значения отклонения плотности светового потока, измеренного при помощи люксметра составляло бы не более 10%, что обеспечивало равные условия воздействия на взвесь бактерий в физиологическом растворе. Облучённую светом с длинами волн  $635\pm 10$  нм и  $450\pm 10$  нм взвесь микроорганизмов объемом 0,1 мл перемещали на чашки Петри с 1% кровавым агаром и инкубировали при температуре  $37^\circ\text{C}$  24 часа в термостате. По инкубации подсчитывали количество выросших колоний *S. aureus*, выражая результаты в КОЕ/мл. Статистический анализ данных проводился с использованием t-критерия Стьюдента, как метода наиболее адекватного с математической точки зрения для данного исследования, различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ роста *S. aureus* на питательной среде после облучения их светом оптического диапазона с длиной волны  $635\pm 10$  нм показал, что данный вид воздействий не обладает бактерицидными свойствами, что подтверждалось 90%, 95%, 80%, 87% ростом *S. aureus* (более 10 КОЕ/мл) в концентрациях  $10^3$  КОЕ/мл. Свет с длиной волны  $450\pm 10$  нм в условиях *in vitro* обладает бактериостатическими свойствами, что подтверждалось снижением на 95% роста *S. aureus* и только 5% ростом *S. aureus* (более 10 КОЕ/мл). Анализ роста *S. aureus* на питательной среде после облучения их светом оптического диапазона с длиной волны  $450\pm 10$  нм показал, что данный вид воздействий обладает бактерицидными свойствами, что подтверждалось 90%, 95%, 80%,

87% ростом *S. aureus* (более 10 КОЕ/мл) в концентрациях  $10^3$  КОЕ/мл, полученные данные, представлены в **Таблице 1**.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Бактерицидный эффект оптического излучения с длиной волны  $450\pm 10$  нм в отношении *S. aureus*, был достоверно выше по отношению эффектам света с длиной волны  $635\pm 10$  нм. По нашему мнению, выраженные бактерицидные эффекты синего света связаны выделением под действием света активных форм кислорода, непосредственно разрушающих клеточную стенку и ядерный аппарат *S. aureus*, вызывая инактивацию ферментов цитоплазмы и клеточной стенки, влияя на процесс синтеза ацетилмурамовой кислоты, что приводит к структурным изменениям мембран *S. aureus*. Кроме того, образование свободнорадикальных форм кислорода при поглощении квантов света фотоакцепторами *S. aureus*, такими как терминальные оксидазы дыхательной цепи митохондрий *S. aureus* может рассматриваться как один из первичных механизмов, запускающих цепь биохимических реакций с токсических биологических эффектов в отношении патогена [6]. Кроме того, бактериостатические эффекты света с длиной волны 450 нм, могут быть обусловлены прооксидантными эффектами данного вида света на реакции перекисного окисления липидов клеточных мембран *S. aureus*, сопровождаемого незначительным усилением активности фермента каталазы [7]. Более того, *S. aureus* сам обладает способностью образования на своей наружной мембране активных форм кислорода, стимуляция которых светом с длиной волны 450 нм

**Таблица 1.** Антибактериальные эффекты оптического монохроматического некогерентного излучения с длиной волны  $635\pm 10$  нм и  $450\pm 10$  нм в отношении *S. aureus*

Диапазон оптического излучения	Тестируемый микробионт	Концентрация тестируемого микробионта <i>S. aureus</i> (КОЕ/мл)			
		$10^3$ КОЕ/мл	$10^4$ КОЕ/мл	$10^5$ КОЕ/мл	$10^6$ КОЕ/мл
$635\pm 10$ нм (красный свет)	<i>S. aureus</i>	Наличие роста <i>S. aureus</i> $3,12\pm 0,12$	Наличие роста <i>S. aureus</i> $4,31\pm 0,19^*$	Наличие роста <i>S. aureus</i> $4,99\pm 0,01^*$	Наличие роста <i>S. aureus</i> $6,00\pm 0,01^*$
$450\pm 10$ нм (синий свет)	<i>S. aureus</i>	Единичные колонии <i>S. aureus</i> $1,02\pm 0,11^{**}$	Единичные колонии <i>S. aureus</i> $1,00\pm 0,10^{**}$	Единичные колонии <i>S. aureus</i> $1,03\pm 0,05^{**}$	Единичные колонии <i>S. aureus</i> $1,00\pm 0,07^{**}$

**Примечание:** КОЕ-колониобразующая единица, \*-достоверность сравниваемых показателей между группами, при действии на *S. aureus* светом с длиной волны  $635\pm 10$  нм, \*\*-достоверность сравниваемых показателей между группами, при действии на *S. aureus* светом с длиной волны  $450\pm 10$  нм и  $635\pm 10$  нм

усиливает респираторный взрыв на поверхности мембранных структур, повреждая сам микроорганизм и формируя гибель *S. aureus* путем осмотического шока даже без экзогенных фотосенсибилизаторов, оказывая фототоксическое действие. Воздействие света с длиной волны 635 нм не выявило прямых бактериостатических эффектов, хотя в некоторых исследовательских работах имеются указания на микробиологические эффекты красного света, связанные с нашим взглядом, с ранее доказанными иммуотропными эффектами красного света, усилением киллинговой активности клеток врожденного иммунитета, выделением фагоцитами активных форм кислорода, повреждающего клеточную стенку патогена. Полученные результаты диктуют необходимость проведения дальнейших экспериментов по изучению влияния различных параметров монохроматического света оптического диапазона.

### ВЫВОД

Выявлены антибактериальные эффекты оптического монохроматического некогерентного излучения с длиной волны  $450 \pm 10$  нм в отношении *S. aureus*, и отсутствие бактериостатических эффектов оптического излучения с длиной волны  $635 \pm 10$  нм в отношении *S. aureus*.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Bardoel B. W. Evasion of Toll-like receptor 2 activation by staphylococcal superantigen-like protein 3. *Journal of Molecular Medicine*.— 2012.— Vol. 90, No 10.— P. 1109–1120.
2. Шетинин С. А., Гизингер О. А., Кормазов А. М. Клинические проявления и дисфункции иммунного статуса у детей с хроническим рецидивирующим аденоидитом и методы их коррекции с использованием озонотерапии. *Российский иммунологический журнал*. 2015, 9 (3), 255–257. [Schetinin S. A., Gizinger O. A., Korkmazov A. M. Clinical manifestations and dysfunctions of the immune status in children with chronic recurrent adenoiditis and methods for their correction using ozone therapy. *Russian immunological magazine*. 2015.9 (3), 255–257.]
3. Гизингер О. А., Ишпахтина К. Г., Колесников О. Л. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы периферической крови доноров в условиях эксперимента. *Иммунология*. 2009; 5: 263–267. [Gizinger O. A., Kolesnikov O. L., Ishpakhtina K. G. The influence of low-intensity laser radiation on neutrophils of donor peripheral blood under experimental conditions. *Immunology*. 2009; 5: 263–267].
4. Долгушин И. И., Гизингер О. А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы цервикального секрета у женщин с микоплазменной инфекцией. *Вопр. курортологии, физиотерапии и лечеб. физкультуры*. 2008. 4, 29–31. [Dolgushin I. I., Gisinger O. A. Effect of low-intensity laser radiation on cervical secretion neutrophils in women with mycoplasma infection. *Vopr. balneology, physiotherapy and treatment. physical education*. 2008. 4, 29–31.]
5. Гизингер О. А., Долгушин И. И. Система провоспалительных цитокинов у женщин с урогенитальным трихомониазом. *Медицинская иммунология*.—2005, 7, 5–6. 601–604. [Gisinger O. A., Dolgushin I. I., The system of proinflammatory cytokines in women with urogenital trichomoniasis. *Medical immunology*. 2005, 7, 5–6, 601–604.]
6. Aeh N. G., Yeh N. G., Wu C. H., Cheng T. C. Light-emitting diodes—their potential in biomedical applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2010, 14 (8), 2161–2166.
7. Guffey J. S., Wilborn J. In vitro bactericidal effects of 405-nm and 470-nm blue light. *Photomed Laser Surg*. 2006, 24(6), 684–688.

**BACTERICIDAL EFFECTS OF MONOCHROMATIC LIGHT 635 NM  
AND 450 NM, WITH RESPECT TO *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*  
IN PATIENTS WITH STAFILODERMY**

© 2019 O. A. Gizinger<sup>1\*</sup>, O. R. Ziganshin<sup>1,2</sup>, A. O. Laknitskaya<sup>2</sup>

\*E-mail: OGizinger@gmail.com

<sup>1</sup>South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia;

<sup>2</sup>Regional Dermatovenerologic Dispensary, Chelyabinsk, Russia

Received: 26.05.2019. Accepted: 30.06.2019

The paper presents the results of a study of the antibacterial properties of monochromatic incoherent light with wavelengths of 635 nm with an average power of 50 mW, a density of 5 J/cm<sup>2</sup> and 450 nm with an average power of 50 mW, an energy density of 5 J/cm<sup>2</sup>, the area of the illuminated zone – 9.25 cm<sup>2</sup>, illumination – 11 mW/cm<sup>2</sup> *in vitro* using *Staphylococcus aureus* strains isolated from the skin of patients with staphylococcal skin lesions, the exposure time to the isolates of microorganisms is 900 seconds, the area of the illuminated zone is 9.25 cm<sup>2</sup>, the illumination is 11 mW/cm<sup>2</sup>. It was established that light with a wavelength of 635 ± 10 nm has poorly pronounced bacteriostatic effects on *Staphylococcus aureus*, which was confirmed by the growth of *Staphylococcus aureus* in isolates after irradiation, light with a wavelength of 450 ± 10 nm, has bacteriostatic properties, which was confirmed by a decrease in the number of *Staphylococcus aureus* colonies after exposure to light with a wavelength of 450 ± 10 nm.

*Key words:* monochromatic light, *S. aureus*, staphylodermia

**Authors:**

**Gizinger O. A.**, ✉ Doctor of Biological Sciences, Professor, Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics of the Federal State Budgetary Educational Institution “South Ural State Medical University”, Chelyabinsk, Russia;

Chelyabinsk, Federal State Budgetary Educational Institution “South Ural State Medical University”. Phone: +79193194604.

**E-mail:** OGizinger@gmail.com

**Ziganshin O. R.**, MD, Professor, Professor of the Department of Dermatology and Venereology of the Federal State Budgetary Educational Institution “South Ural State Medical University”, Chelyabinsk, Russia; Chief Physician of the Regional Dermatovenerologic Dispensary, Chelyabinsk, Russia;

**Laknitskaya A. O.**, the doctor-dermatologist regional regional dermatovenerologic dispensary, Chelyabinsk, Russia.

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО АДЕНОИДИТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОХРОМАТИЧЕСКОГО КОГЕРЕНТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ С ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 635 НМ

© 2019 г. О. А. Гизингер\*, Н. В. Корнова, К. С. Зырянова,  
Р. А. Иванова, В. Е. Назарова

\*E-mail: OGizinger@gmail.com

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»,  
Челябинск, Россия

Поступила: 26.05.2019. Принята: 30.06.2019

В работе приведены результаты исследования эффективности комплексной терапии хронического аденоидита с использованием монохроматического когерентного излучения с длиной волны 635 нм, генерируемого аппаратом «Мустанг». Параметры излучения: длина волны 635 нм, мощность на выходе 6–8 мВт, эндоназально, время воздействия 60 с, доза излучения 0,5 Дж/см<sup>2</sup>, курс 10 сеансов. Установлено, что применение монохроматического когерентного излучения с длиной волны 635 нм способствовало нормализации факторов врождённого и адаптивного иммунитета периферической крови, восстановлению рецепторного пейзажа лимфоцитов, снижало степень обсеменения патогенной микрофлорой глоточной миндалины, снижало количество обострений хронического аденоидита.

**Ключевые слова:** монохроматический свет, аденоидит, иммунитет

DOI: 10.31857/S102872210007236-4

**Адрес:** Челябинск, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Гизингер Оксана Анатольевна. Тел.: +7919 319 46 04 (моб.).

**E-mail:** OGizinger@gmail.com

**Авторы:**

**Гизингер О. А.**, д.б.н., профессор, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Челябинск, Россия;

**Корнова Н. В.**, к.м.н., ассистент кафедры оториноларингологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Челябинск, Россия;

**Зырянова К. С.**, к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Челябинск, Россия;

**Назарова В. Е.**, студентка 5 курса педиатрического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Челябинск, Россия;

**Иванова Р. А.**, студентка 5 курса педиатрического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Челябинск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Заболевания лимфоглоточного кольца являются доминирующей патологией в оториноларингологии [1]. Глоточная миндалина, реализуя функционал мукозального иммунитета (MALT – mucosa-associated lymphoid tissue), играет ключевую роль в развитии полноценного адаптивного иммунитета, путем процессинга антигенов [2]. Развитие воспаления глоточной миндалины, и, как следствие, ее гипертрофии, связано с рядом факторов: частые эпизоды острой вирусной инфекции, аллергия, хроническая вирусная инфекция (герпес-группа: ЦМВ, герпес-вирусы 1, 2, 6-го типов, аденовирусы), внутриклеточная инфекция респираторного тракта (хламидии, микоплазмы) [3]. У пациентов с рецидивирующим хроническим воспалительным процессом глоточной миндалины достоверно часто, на фоне приема антибактериальных препаратов формируется антибиотико-резистентность, нарушение иммунного регулирования на поверхности глоточной миндалины.

Консервативное лечение хронического аденоидита включает элиминационную, антимикробную, десенсибилизирующую, мукорегулирующую терапию и физиолечение [4]. Особый интерес представляет терапия хронического аденоидита с использованием монохроматического когерентного излучения с длиной волны 635 нм, которая иллюстрирует один из постулатов лазерной терапии, о том, что при локальном воздействии отмечается эффект от действия лазерного излучения низкой интенсивности как на органном, так и на органическом уровне [5]. Вышеперечисленные обстоятельства определили **цель исследования** – проведение анализа эффективности терапии хронического аденоидита с использованием монохроматического когерентного излучения с длиной волны 635 нм.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на базе коммерческих медицинских центров г. Челябинска, ООО «Лаборатория Гемотест», ОГРН 1027709005642, Лицензия: № ЛО-50-01-009799 от 19.06.2018 г. осуществляет определение элементного состава в сыворотке крови, волосах, моче и других биологических жидкостях. Реализация технологического процесса при выполнении исследований в ООО «Лаборатория Гемотест» отвечает требованиям международного стандарта менеджмента качества ISO: 15189:2007 и ISO: 9001:2015. От пациентов было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с основами законодательства РФ «Об охране здоровья граждан, правил проведения клинической практики в РФ», (приказ МЗ РФ № 266 от 19.07.03 г.; приказ Росздравнадзора № 2325-Пр/06 от 17.10.06 г.). В исследовании участвовало 60 мужчин и женщин (50/50%), с признаками хронического аденоидита, с рецидивами заболевания в анамнезе до 5 раз в год. Все пациенты были разделены на 2 группы. Группа 1 включала 30 человек, которым проводилось орошение носа и носоглотки физиологическим раствором дважды в день в течение 3 месяцев. Дополнительно данной группе детей проводили лазеротерапию аппаратом «Мустанг» (Россия). Красным непрерывным излучением (длина волны 635 нм, мощность 6–8 мВт), время воздействия 60 с, доза излучения 0,5 Дж/см<sup>2</sup>, 10 сеансов. Группа 2 – сравнения, состояла из 30 пациентов, сопоставимых по возрасту и полу, которые получали орошение носа и носоглотки физиологическим раствором дважды в день в те-

чение 3 месяцев. Иммунологическую эффективность лазеротерапии оценивали путём анализа функциональной активности нейтрофилов периферической крови по их способности к поглощению частиц латекса, кислородзависимому метаболизму, функциональному резерву через 10 дней после завершения лазеротерапии и затем через 3 месяца после окончания лечения. Методом проточной цитофлуориметрии исследовали субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови на проточном цитофлуориметре с помощью набора моноклональных антител (МАТ) («BeckmanCoulter», США). Бактериологическое обследование материала с поверхности глоточной миндалины, забранного под контролем эндоскопа, проводилось с определением вида микробов и чувствительности бактериальных штаммов к антибиотикам стандартным диско-диффузным методом трижды в сроки клинического мониторинга. Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием пакетов прикладных программ «SPSS for Windows 13.0». Для анализа нормальности распределения данных применяли критерий Шапиро-Уилка. Для вычисления относительного вклада клинических признаков в развитие исследуемой патологии и оценки эффективности применения терапевтических мероприятий использовали  $\chi^2$ -квадрат, односторонний точный критерий Фишера, различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Микробиологическое исследование в динамике проводилось у 100% детей всех сравниваемых групп, включённых в исследование. Наиболее часто встречаемыми патобионтами хронического рецидивирующего аденоидита были: *S. aureus*, *S. pneumonia*, *H. influenzae*, реже *S.  $\beta$ -haemolyticus*, *M. catarrhalis*, *K. pneumonia*, *Candida spp.* В 87% случаев были выявлены ассоциации резидентной флоры из *S.  $\alpha$ -haemolyticus* в количестве 10<sup>5</sup>–10<sup>6</sup> КОЕ/мл и *S. epidermidis* в количестве 10<sup>4</sup> КОЕ/мл с патогенной микрофлорой., полученные данные, представлены в таблице. Через 10 дней от начала лечения регистрировалось уменьшение штаммов патогенной микрофлоры. Через 3 месяца отмечена полная санация от *H. influenzae* и *M. catarrhalis*, на фоне скудного роста остальных патобионтов при неизменном уровне резидентной микрофлоры. В группе сравнения (пациенты, пролеченные без исполь-

**Таблица 1.** Микробиологическая эффективность комплексной терапии хронического аденоидита с использованием монохроматического когерентного излучения с длиной волны 635 нм

Вид микробионта (количество штаммов)	Группа 1 Элиминационная терапия+ монохроматическое когерентное излучение с длиной волны 635 нм (n= 30)			Группа 2 Элиминационная терапия (n=30)		
	До лечения	Через 10 дней после лечения	Через 3 месяца после лечения	До лечения	Через 10 дней после лечения	Через 3 месяца после лечения
<i>S. aureus</i>	++++	++	+	++++	+++	+++
<i>S. pneumonia</i>	++++	++	+	++++	+++	+++
<i>H. influenzae</i>	++++	++	-	++++	++	+++
<i>S. β-haemoliticus</i>	+++	++	++	+++	+++	++
<i>M. catarrhalis</i>	+++	+	-	++	++	++
<i>K. pneumonia</i>	+++	++	+	++	+	++
<i>Candida spp.</i>	+	+	+	+	+	-

**Примечание:** ++++ обильный рост (сплошной рост), +++ умеренный рост (не менее 50 колоний), ++ скудный рост (10–25 колоний), + очень скудный рост (до 10 колоний), – роста нет

зования физиотерапии) отмечено незначительное уменьшение ( $p \geq 0,05$ ) патогенной микрофлоры по окончании курса элиминационной терапии, однако положительная динамика по снижению количества патобионтов отсутствовала, и контаминация патогенными штаммами через 3 месяца от начала лечения практически вернулась к исходному количеству. Через 3 месяца после завершения лечения с применением физиотерапии зарегистрированы достоверные положительные изменения иммунологических показателей периферической крови: восстановление количественного и субпопуляционного состава лейкоцитов, нормализации межклеточных взаимоотношений субпопуляций Т-лимфоцитов, а именно повышение относительно количества популяций Т- и В-лимфоцитов, иммунорегуляторного индекса, что приводило к увеличению их количества в периферической крови, нормализации роста поглотительной способности нейтрофилов в тесте с частицами латекса, восстановление биоцидной функции фагоцитов в НСТ-тесте, нормализации функционального резерва фагоцитов.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Выявленная положительная динамика иммунологических и микробиологических показателей свидетельствует о восстановлении потенциала факторов врождённого и адаптивного иммунитета у пациентов, получивших лечение с при-

менением монохроматического когерентного излучения с длиной волны 635 нм. У пациентов, пролеченных без использования монохроматического когерентного излучения с длиной волны 635 нм степень нормализации факторов антимикробной защиты была достоверно менее выраженной. При динамическом клиническом наблюдении пациентов в течение трех месяцев по окончании терапии было выявлено: за данный промежуток времени у 10 пациентов из группы сравнения произошло обострение хронического аденоидита на фоне ОРЗ, 7 из них был назначен системный антибиотик. В основной группе получавших лечение с применением монохроматического когерентного излучения с длиной волны 635 нм лазеротерапию обострение хронического аденоидита было отмечено у 2 пациентов, из них только был назначен системный антибиотик.

### ВЫВОДЫ

1. Для определения тактики ведения пациентов с хроническим аденоидитом целесообразно определять этиологическую значимость выявленных агентов, проводить микробиологический мониторинг выявляемых патобионтов и проводить оценку факторов врождённого и адаптивного иммунитета

2. Комплексная терапия с использованием монохроматического когерентного излучения с длиной волны 635 нм стимулирует и норма-

лизует функциональную активность фагоцитов, что проявляется в нормализации абсолютно и относительного количества нейтрофилов, восстановлении потенциала нейтрофильных гранулоцитов в НСТ-тесте, повышении функционального резерва, усилении поглотительных способностей и фагоцитарного числа нейтрофилов, способствует восстановлению нормоценоза на поверхности аденоидных вегетаций.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Rojy A., Chorostowska-Wynimko J. Bacteria limmuno stimulants – mechanism of action and clinical application in respiratory diseases Pracawpiynkia do Redakcji: Copyright© 2008 Via Medica, 235.
2. Щетинин С. А., Гизингер О. А., Коркмазов А. М. Клинические проявления и дисфункции иммунного статуса у детей с хроническим рецидивирующим аденоидитом и методы их коррекции с использованием озонотерапии Российский иммунологический журнал. 2015,9 (3), 255–257. [Schetinin S. A., Gizinger O. A., Korkmazov A. M. Clinical manifestations and dysfunctions of the immune status in children with chronic recurrent adenoiditis and methods for their correction using ozone therapy. Russian immunological magazine. 2015.9 (3), 255–257.]
3. Гизингер О. А., Ишпахтина К. Г., Колесников О. Л. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы периферической крови доноров в условиях эксперимента. Иммунология. 2009; 5: 263–267. [Gizinger O. A., Kolesnikov O. L., Ishpakhtina K. G. The influence of low-intensity laser radiation on neutrophils of donor peripheral blood under experimental conditions. Immunology. 2009; 5: 263–267].
4. Долгушин И. И., Гизингер О. А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы цервикального секрета у женщин с микоплазменной инфекцией. Вopr. курортологии, физиотерапии и лечеб. физкультуры. 2008. 4, 29–31. [Dolgushin I. I., Gizinger O. A. Effect of low-intensity laser radiation on cervical secretion neutrophils in women with mycoplasma infection. Vopr. balneology, physiotherapy and treatment. physical education. 2008. 4, 29–31.]
5. Гизингер О. А., Долгушин И. И. Система провоспалительных цитокинов у женщин с урогенитальным трихомониазом. Медицинская иммунология. –2005, 7, 5–6. 601–604. [Gizinger O. A., Dolgushin I. I., The system of proinflammatory cytokines in women with urogenital trichomoniasis. Medical immunology. 2005, 7, 5–6, 601–604.]
6. Espinosa B. E., Del-Rio-Navarro B. E., Rosales J. L. Sienra-Monge. Cochrane Database of Systematic Reviews 2018 [Review] Immunostimulants for preventing respiratory tract infection in children: 18 October 2018.
7. Гизингер О. А., Коркмазов А. М., Коркмазов М. Ю. Состояние факторов антимикробной защиты назального секрета у пациентов, оперированных по поводу искривления носовой перегородки в ранний послеоперационный период. Российский иммунологический журнал. 2017; 11(2): 117–119. [Gizinger O. A., Korkmazov A. M., Korkmazov M. Yu. The state of antimicrobial protection factors of nasal secretion in patients operated in patients operated on the curvature of the nasal septum in the early postoperative period. Rossiiskii immunologicheskii zhurnal. 2017; 11(2): 117–119.]

### EFFICIENCY OF COMPLEX THERAPY OF CHRONIC ADENOIDITIS USING MONOCHROMATIC COHERENT RADIATION WITH A WAVE LENGTH OF 635 NM

© 2019 O. A. Gizinger\*, N. V. Kornova, K. S. Zyryanova, R. A. Ivanova, V. E. Nazarova

\*E-mail: OGizinger@gmail.com

South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Received: 26.05.2019. Accepted: 30.06.2019

The paper presents the results of a study of the effectiveness of complex therapy of chronic adenoiditis using monochromatic coherent radiation with a wavelength of 635 nm generated by the Mustang apparatus. Radiation parameters: 635 nm wavelength, output power 6–8 mW, endonasal, exposure time 60 s, dose radiation of 0.5 J/cm<sup>2</sup>, a course of 10 sessions. It was established that the use of monochromatic coherent radiation with a wavelength of 635 nm contributed to the normalization of factors of innate and adaptive peripheral immunity Blood Coy, landscape restoration lymphocyte receptor, reduced the degree of contamination of pathogenic microorganisms pharyngeal tonsils, reduced the number of exacerbations of chronic adenoiditis.

*Key words:* monochromatic light, adenoiditis, immunity

**Authors:**

**Gizinger O. A.**, ✉ Doctor of Biological Sciences, Professor, Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics of the Federal State Budgetary Educational Institution “South Ural State Medical University”, Chelyabinsk, Russia;

Chelyabinsk, Federal State Budgetary Educational Institution “South Ural State Medical University”. Phone: +79193194604.

**E-mail:** OGizinger@gmail.com

**Natalya V. K.**, PhD, Assistant Professor, Department of Otorhinolaryngology, Federal State Budgetary Educational Institution “South Ural State Medical University”, Chelyabinsk, Russia;

**Zyryanova K. S.**, PhD, Associate Professor of the Department of Otorhinolaryngology, Federal State Budgetary Educational Institution “South Ural State Medical University”, Chelyabinsk, Russia;

**Nazarova V. E.**, 5th year student of the Pediatric Faculty of the Federal State Budgetary Educational Institution “South Ural State Medical University”, Chelyabinsk, Russia;

**Ivanova R. A.**, 5th year student of the Pediatric Faculty of the Federal State Budgetary Educational Institution “South Ural State Medical University”, Chelyabinsk, Russia.

## ИММУНОПОЭЗМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ОРИГИНАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА БИОФЛАВОНОИДОВ «ЭПИГЕНОРМ АНТИВИР»

© 2019 г. И. А. Гольдина<sup>1\*</sup>, Е. В. Маркова<sup>1,2</sup>, И. А. Орловская<sup>1</sup>,  
Л. Б. Топоркова<sup>1</sup>

\*E-mail: [iigoldina@mail.ru](mailto:iigoldina@mail.ru)

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной  
и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный педагогический университет»,  
Новосибирск, Россия

Поступила: 14.05.2019. Принята: 25.06.2019

Биофлавоноиды пищевых растений обладают химиопротекторными и иммуномодулирующими свойствами, в том числе способностью воздействовать на самые ранние этапы иммунопоэза, поэтому разработка комплексных адьювантных терапевтических композиций на их основе представляет несомненную актуальность. Целью настоящего исследования было выявление иммунопоэзomodулирующих и химиопротекторных свойств оригинального комплекса природных пищевых полифенолов «Эпигенорм антивир». В результате проведенного исследования было установлено, что «Эпигенорм антивир» повышает функциональную активность стволовых кроветворных клеток костного мозга – ранних общих предшественников гемопоэза, а также обладает химиопротекторными свойствами, увеличивая функциональную активность стволовой кроветворной клетки в условиях иммуносупрессии.

**Ключевые слова:** биофлавоноиды, стволовые кроветворные клетки, функциональная активность, иммуносупрессия

DOI: 10.31857/S102872210007237-5

Адрес: 630099, Новосибирск, ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», Гольдина Ирина Александровна.

Тел.: +79059368880, E-mail: [iigoldina@mail.ru](mailto:iigoldina@mail.ru)

**Авторы:**

**Гольдина И. А.**, научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», Новосибирск, Россия;

**Маркова Е. В.**, д.м.н., заведующая лабораторией нейроиммунологии, главный научный сотрудник ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия; профессор ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный педагогический университет», Новосибирск, Россия;

**Орловская И. А.**, д.м.н., проф., руководитель лаборатории иммунобиологии стволовой клетки ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», Новосибирск, Россия;

**Топоркова Л. Б.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунобиологии стволовой клетки ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», Новосибирск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Формирование онкологического процесса в организме индивидуума находится в динамическом взаимодействии с функцией иммунной системы. Опухолевый рост сопровождается подавлением ряда параметров иммунной системы. Раковые клетки и иммуносупрессивное микроокружение опухоли выработали множество клеточных и молекулярных механизмов «ускользания» от противоопухолевого иммунного ответа, например, выработку растворимых факторов, таких как ИЛ-10, фактор роста опухоли  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), фактор роста сосудов эндотелия (VEGF). Данные факторы, наряду с подавлением эффекторных функций иммунных клеток, способны нарушать их созревание, воздействуя на ранние стадии иммунопоэза [1].

Современные средства химиотерапии опухолей, в свою очередь, также вызывают глубокую

дисфункцию иммунной системы, что значительно осложняет процесс лечения онкологического больного. Развитие нутриционной иммунологии открывает широкие перспективы для выработки эффективных схем адъювантной терапии в онкологии с использованием продуктов функционального питания с иммуномодулирующими свойствами. Известно, что стволовые кроветворные клетки (СКК) костного мозга обеспечивают гомеостатический гемопоэз в течение жизни индивидуума, а также его регенерацию после миелоабляции [2]. В костном мозге СКК расположены в трехмерных структурах, названных «нишами», обеспечивающими регуляцию функциональной активности СКК. Молекулярный и клеточный состав ниш представлен эндостальными клетками, остеобластами, синусоидальными эндотелиальными, нейрональными, *Cxcl12* ретикулярными клетками, Nestin<sup>+</sup> периваскулярными мезенхимальными стромальными клетками, а также мегакариоцитами, секретирующими цитокины, остеопонтин, тенасцин-С, гиалуронан, регулируемыми функциональный статус СКК – самоподдержание, пролиферацию и дифференцировку [3]. Повышение функциональной активности СКК является эффективным способом коррекции побочных эффектов химиотерапии.

Учитывая, что биофлавоноиды пищевых растений оказывают химиопротекторное и иммуномодулирующее действие и способны воздействовать на самые ранние этапы иммунопоеза [4], разработка комплексных адъювантных терапевтических композиций на их основе представляет несомненную актуальность.

**Целью** настоящего исследования было выявление иммуномодулирующих и химиопротекторных свойств оригинального комплекса природных пищевых полифенолов «Эпигенорм антивир».

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на здоровых половозрелых мышах C<sub>57</sub>Bl/6, самках, 8–10 недельного возраста, массой тела 20–22 г. (НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга, г. Томск). Животные содержались в условиях вивария НИИФКИ, на стандартном рационе питания, при естественном световом режиме, свободном доступе к воде и пище. Все манипуляции выполнялись в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных

научных целей (Страсбург, 1986). Эксперименты проводили в соответствии с приказом Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» и «Руководством по экспериментальному (доклиническому) исследованию новых фармакологических веществ» (Москва, 2005). По окончании экспериментов животных декапитировали, соблюдая «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных». Морфометрические параметры лимфоидных органов оценивали, как было описано нами ранее [5]. Суспензию препарата «Эпигенорм антивир» (опытная группа) или порошка корневищ куркумы (Kolvi, India) (контрольная группа) принудительно вводили животным из расчета 10 мг/мышь, *per os*, ежедневно, в течение 14 суток. С целью исследования влияния препарата «Эпигенорм антивир» на функциональную активность СКК *in vitro*, оценивали количество кроветворных клеток-предшественников костного мозга различных направлений дифференцировки в культуре на метилцеллюлозной среде на 15 сутки от начала кормления биофлавоноидами. С этой целью костный мозг из бедренных костей в стерильных условиях вымывали средой RPMI-1640 с добавлением 10% объема фетальной коровьей сыворотки, и культивировали в 24-луночных планшетах в концентрации  $50 \times 10^3$ /мл в метилцеллюлозной среде М 3434 в течение 14 суток в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37 °С и содержании в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. По окончании культивирования подсчитывали количество гранулоцитарно-макрофагальных (КОЕ-ГМ), эритроидных (КОЕ-Э, бурстобразующих и поздних эритропоэтинзависимых колониеобразующих единиц), смешанных колоний (КОЕ-ГЭММ, гранулоцитарно-эритроидно-макрофагально-мегакариоцитарных колониеобразующих единиц), а также общее количество колониеобразующих единиц (КОЕ) на 100 000 клеток костного мозга.

Цитостатическая иммуносупрессия воспроизводилась введением животным циклофосфана (– N'-бис-(–Хлорэтил)-N'-О-триметиленовый эфир диамида фосфорной кислоты) (ЦФ), (Бакстер Онкология, ГмбХ, Германия), внутрибрюшинно однократно, в 0,5 мл 0,9% NaCl на 5 сутки после начала кормления нутрицевтиком, в дозе 250 мг/кг. Для оценки функциональной активности СКК на фоне приема цитостатика, исследовали их способность формировать эндогенные колонии в селезенке мышей на 9 сутки после введения ЦФ.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью коммерческого пакета программ Statistica 10.0 (SatSoft, USA), непараметрического критерия Манна-Уитни. Результаты представлены в виде медианы и интервала между 1-м и 4-м квартилем (Me (25%;75)). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Производителем ООО «Доктор Корнилов» (г. Барнаул, Россия. www.dokskor.ru), совместно с ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии» (г. Новосибирск, Россия) был разработан инновационный парафармацевтик «Эпигенорм антивир» (№ регистрации: RU.77.99.88.003.E.002022.04.17 от 27.04.2017), содержащий в своём составе экстракты корня солодки, куркумы, зелёного чая, листьев облепихи. Для выявления влияния данного парафармацевтика на функциональную активность СКК костного мозга экспериментальных животных была изучена их способность формировать колонии различных ростков кроветворения в культуре. Полученные результаты представлены в **Таблице 1**.

Обнаруженное в данном эксперименте увеличение количества КОЕ-ГЭММ под влиянием исследуемого препарата, свидетельствует о его способности повышать функциональную активность стволовых кроветворных клеток – ранних общих предшественников гемопоэза.

Далее мы исследовали влияние парафармацевтика на функциональную активность СКК в условиях иммуносупрессии, индуцированной ЦФ. В серии предварительных экспериментов была проведена оценка выраженности иммуносупрессии на основании исследования динамики изменения количества лейкоцитов периферической крови, а также морфометрических параметров лимфоидных органов (**Таблицы 2, 3**).

Было установлено, что введение ЦФ во всех исследованных дозах сопровождается развитием лейкопении на 2 сутки эксперимента; к 9 суткам величина данного параметра возвращается к исходным значениям. Учитывая, что выраженность иммуносупрессии на фоне введения ЦФ не зависела от дозы препарата, в последующих экспериментах использовалась средняя дозировка ЦФ 250 мг/кг. Полученные данные свидетельствуют о снижении массы лимфоидных органов при воздействии ЦФ.

**Таблица 1.** Колониеобразующая активность стволовых кроветворных клеток костного мозга мышей при воздействии нутрицевтика «Эпигенорм антивир» (Me(25%;75))

Группы животных	Интактные	Куркума	«Эпигенорм антивир»
Эритроидные (КОЕ-Э + БОЕ-Э)	730 (600; 1520)	1110(820; 1240)	610 (480; 780)
КОЕ-Э	110 (100; 300)	160 (160; 300)	150 (120; 180)
КОЕ-ГМ	240 (80; 260)	120 (100; 200)	200 (200; 220)
КОЕ-ГЭММ	40 (20; 40)	30 (20; 40)	50 (40; 80)*
КОЕ	1090 (840; 1740)	1270 (1080; 1360)	840 (760; 980)

**Примечание:** \* – достоверность различия с контрольной группой  $p < 0,05$ ;  $n=6$  в каждой группе.

**Таблица 2.** Динамика количества лейкоцитов в периферической крови мышей после введения циклофосфана (Me(25%;75))

Группа животных	Количество лейкоцитов, $10^9/л$		
	0 сут	2-е сут	9-е сут
Контроль	14,38 (10,0; 18,25)	15,8 (13,75; 17,0)	17,7(16,5; 19,3)
Циклофосфан 125 мг/кг	15,79 (9,0; 16,30)	5,52 (3,25; 7,0)*	13,54 (11,25; 16,0)
Циклофосфан 250 мг/кг	14,10 (11,2; 17,15)	2,82 (1,43; 3,8)*	15,05 (13,5; 15,0)
Циклофосфан 450 мг/кг	13,23 (9,30; 16,95)	3,59 (2,5; 5,05)*	14,25 (10,5; 15,25)

**Примечание:** \* – достоверность различия с контрольной группой ( $p < 0,05$ );  $n=10$  в каждой группе.

**Таблица 3.** Морфометрические параметры лимфоидных органов под действием циклофосфана (Ме(25%;75))

Группы животных	Масса тела животного, г	Масса тимуса, г		Масса селезенки, г	
		Абсолютная	Относительная	Абсолютная	Относительная
1. Интактные	22,2 (20,1; 22,5)	0,070 (0,061; 0,082)	0,003	0,103 (0,92; 0,118)	0,045
2. Куркума	20,3 (19,8; 21,9)	0,075 (0,070; 0,080)	0,004	0,122 (0,104; 0,141)	0,059
3. «Эпигенорм антивир»	21,7 (19,1; 22,8)	0,071 (0,067; 0,080)	0,004	0,108 (0,90; 0,113)	0,046
4. ЦФ	21,7 (19,1; 22,4)	0,040* (0,031; 0,050)	0,001*	0,64 (0,51; 0,80)*	0,028

**Примечание:** \* – достоверность различия с контрольной группой ( $p < 0,05$ );  $n = 10$  в каждой группе.

Следовательно, введение ЦФ экспериментальным животным в дозе 250 мг/кг сопровождается развитием у них иммуносупрессии.

При изучении влияния исследуемого парафармацевтика на функциональную активность СКК костного мозга *in vivo* на фоне индуцированной иммуносупрессии, на основании оценки количества эндогенных колоний, образованных СКК в селезенке мышей, были получены результаты, представленные в **Таблице 4**.

**Таблица 4.** Функциональная активность стволовых кроветворных клеток под влиянием парафармацевтика «Эпигенорм антивир» на фоне иммуносупрессии (Ме (25%;75))

Группа животных	Количество колоний, ед.
1. Контроль (ЦФ)	1,5 (0,5; 2,5)
2. ЦФ, куркума	3,0 (1,0; 3,5)
3. ЦФ, «Эпигенорм антивир»	4,5 (2,5; 5,5)*

**Примечание:** \* – достоверность различия с группой интактных животных ( $p < 0,05$ );  $n = 10$  в каждой группе.

Данные, полученные в этом эксперименте, свидетельствуют об увеличении функциональной активности СКК под действием исследуемого парафармацевтика *in vivo*.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полифенолы представляют собой группу биофлавоноидов, присутствующую преимущественно в растениях и выполняющих ключевую роль в регуляции роста и метаболизма. У человека доказана эффективность полифенолов в защите от оксидативного стресса, регуляции липидного и углеводного обмена, коррекции ряда механизмов формирования нейродегенеративных и онкологических процессов [6, 7, 8].

Следует отметить, что комбинации полифенолов более эффективны в подавлении опухолевого роста, чем изолированные компоненты, благодаря реципрокным взаимодействиям, повышающим их биодоступность [9]. Данный подход, наряду с механохимической обработкой компонентов композиции, повышающей содержание частиц наноразмерного диапазона [10] и был использован для создания исследуемого парафармацевтика.

Биофлавоноиды, входящие в состав «Эпигенорма антивир» способны повышать функциональную активность стволовых клеток различных направлений дифференцировки. Так, полифенольные соединения зеленого чая (*Camellia sinensis*), представленным преимущественно катехинами, изменяют дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, усиливает остеобластогенез и супрессирует остеокластогенез путем стимуляции экспрессии остеогенез-связанных генов (BMP2, Runx2) [11]. Проантоцианидины облепихи *Hippophae rhamnoides L.* (Sea buckthorn) приводили к мобилизации в кровяное русло различных типов стволовых клеток – CD45<sup>dim</sup> CD34<sup>+</sup> CD309<sup>-</sup> клеток-предшественников, CD45<sup>-</sup> CD31<sup>+</sup> CD309<sup>+</sup> эндотелиальных стволовых клеток и CD45<sup>-</sup> CD90<sup>+</sup> лимфоцитоподобных мезенхимальных стволовых клеток [12]. Глицерризиновая кислота, пентациклический тритерпеноид, активный компонент солодки (*Licorice, Glycyrrhiza*), способна подавлять остеокластогенез преостеокластов, снижать экспрессию катепсина К, блокируя формирование колец актина и подавляя функцию остеокластов на ранних стадиях дифференцировки путем подавления, RANKL-индуцированного фосфорилирования p65, p50, и I $\kappa$ B, блокируя ядерную транслокацию p65, снижая ДНК-связывающую активность NF- $\kappa$ B [13]. Молекула куркумина (diferuloylmethane), активного компонента кор-

невищ *Curcuma longa*, плейотропна и рассматривается как геномодулирующий агент, обладающий широким спектром фармакологических свойств – антиоксидантных, противоопухолевых, противовоспалительных.

Повышение функциональной активности СКК костного мозга под действием куркумина установлено в ряде исследований, с которыми согласуются полученные нами данные. Так, обработка клеток костного мозга куркумином увеличивала их выживаемость и пролиферативную активность [4]. Стимуляция миелопоэза под влиянием куркумина выявлена авторами [14], которые установили увеличение количества клеток костного мозга, снижение их апоптоза у животных-опухоленосителей. Куркумин модулировал экспрессию молекул, ответственных за выживаемость клеток – Bcl2, p53, каспазо-активированной ДНКзы и p53-регулируемого модулятора апоптоза, наряду с повышением экспрессии генов рецепторов M-CSF и GM-CSF, что сопровождалось стимуляцией колониобразования и моноцитарно-макрофагальной дифференцировки СКК. Куркумин также изменял соотношение TH1/TH2 с увеличением продукции IFN- $\gamma$  и последующей продукцией монокинов – IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , которые увеличивали выживаемость СКК [15], а также восстанавливал повреждения ДНК в СКК, активируя сигнальные пути гомологичной рекомбинации и восстановления эксцизии нуклеотидов, в которых задействованы протеины предрасположенности к раку молочной железы 1 и 2 типов (BRCA1, 2), а также DNA excision repair protein (ERCC-1). Авторами [16] было обнаружено, что куркумин путем стимуляции экспрессии BRCA1, BRCA2 и ERCC1 редактирует миелосупрессию, индуцированную повреждением ДНК. Другим возможным механизмом регуляции функциональной активности СКК куркумином может быть его способность повышать экспрессию остеопонтина в клетках кроветворного микроокружения [17].

Установленное в настоящем исследовании повышение функциональной активности СКК под влиянием комплекса биофлавоноидов и отсутствие такового при воздействии нативной куркумы, основного ее компонента, обусловлено, по-видимому, низкой биодоступностью куркумина вследствие его низкой растворимости и высокого уровня биодegradации. Примененная нами механохимическая технология получения композиции биофлавоноидов позволила изменить фазовое состояние исходных

компонентов – многократно увеличить долю наиболее мелких биологически активных частиц биофлавоноидов в механокомposite, влияющих на функциональную активность СКК.

## ВЫВОДЫ

1. Комплекс биофлавоноидов «Эпигенорм антивир» повышает функциональную активность СКК костного мозга – ранних общих предшественников гемопоэза.

2. «Эпигенорм антивир» обладает химиопротекторными свойствами, увеличивая функциональную активность СКК в условиях иммуносупрессии.

(Работа выполнена по теме из Плана НИР НИИФКИ, № гос. Регистрации 01201356998)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Ohm J. E., Carbone D. P. VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency. *Immunol. Res.* 2001, 23(2–3), 263–72.
2. Weissman I. L. Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000, 100, 157–168.
3. Wei Q., Frenette P. S. Niches for hematopoietic stem cells and their progeny. *Immunity* 2018, 48, 632–648.
4. Attari F., Zahmatkesh M., Aligholi H., Mehr S. E., Sharifzadeh M., Gorji A., Mokhtari T., Khaksarian M., Hassanzadeh G. Curcumin as a double-edged sword for stem cells: dose, time and cell type-specific responses to curcumin. *Daru* 2015, 23, 33. doi: 10.1186/s40199-015-0115-8.
5. Гайдуль К. В., Гольдина И. А., Сафронова И. В. Исследование морфометрических параметров органов иммунной системы под действием нутрицевтика эпигеном-направленного действия на фоне экспериментальной гемодепрессии. Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке» 2018, 20, (10), 10–13. dx.doi.org/10.26787/nydha-2226-7425-2018-20-10-10-13. [Gaidul K. V., Goldina I. A., Safronova I. V. Investigation of morphometric parameters of lymphoid organs under the influence of nutraceutical with epigenome-directed effect on the experimental hemodepression base. *Journal of scientific articles "Health and education in XXI century"* 2018, 20(10), 10–13. dx.doi.org/10.26787/nydha-2226-7425-2018-20-10-10-13.]
6. Гольдина И. А., Гайдуль К. В. Биологическая активность и терапевтические свойства *Curcuma Longa L.* (Обзор литературы) Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина 2015, 13(1), 106–114. [Goldina I. A., Gaidul K. V. Biological activity and therapeutic properties of *Curcuma Longa L.* (Review). *Annual of Novosibirsk's state university. Series: Biology, clinical medicine* 2015, 13(1), 106–114.]
7. Гольдина И. А., Маркова Е. В., Гольдин Б. Г., Княжева М. А., Гайдуль К. В. Протекторные свойства

- экстракта куркумы при этанолиндуцированных нарушениях поведения. Саратовский научно-медицинский журнал 2017, 13(1), 131–135. [Goldina I. A., Markova E. V., Goldin B. G., Kniajeva M. A., Gaidul K. V. Protection properties of curcuma extract at ethanol-induced behavior disturbances. Saratov's scientific-medical journal 2017, 13(1), 131–135.]
8. Любимов Г. Ю., Гольдина И. А., Гайдюль К. В., Козлов В. А. Противоопухолевые свойства экстракта корневищ *Curcuma Longa L.* в глицерине на модели роста экспериментальной меланомы мышей B16. Сибирский научный медицинский журнал 2016, 36(4), 56–60. [Lubimov G. U., Goldina I. A., Gaidul K. V., Kozlov V. A. Antitumor properties of *Curcuma Longa L* radix glycerin extract on toe model of experimental melanoma B16 growth. Siberian scientific medical journal 2016, 36(4), 56–60.]
  9. Piao L., Mukherjee S., Chang Q., Xie X., Li H., Castellanos M. R., Banerjee P., Iqbal H., Ivancic R., Wang X., Teknos T. N., Pan Q. TriCurin, a novel formulation of curcumin, epicatechin gallate and resveratrol, inhibits the tumorigenicity of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016, 8(36), 60025–60035. doi: 10.18632/oncotarget.10620. doi: 10.18632/oncotarget.10620.
  10. Душкин А. В., Гайдюль К. В., Гольдина И. А., Гуськов С. А., Евсеенко В. И., Ляхов Н. З., Козлов В. А. Антимикробная активность механохимически синтезированных композитов антибиотиков и наноструктурированного диоксида кремния. Доклады АН 2012, 443(1), 120–122. [Dushkin A. V., Gaidul K. V., Goldina I. A., Guskov S. A., Evseenko V. I., Lyachov N. Z., Kozlov V. A. Antimicrobial activity of mechanochemically synthesized composites of antibiotics and nanostructured silicium dioxide. Reports of the academy of science 2012, 443(1), 120–122.]
  11. Lin S. Y., Kang L., Wang C. Z., Huang H. H., Cheng T. L., Huang H. T., Chen C. H. (–)-Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Enhances Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Molecules* (Basel, Switzerland) 2018, 23(12), 3221. doi:10.3390/molecules23123221.
  12. Drapeau C., Benson K. F., Jensen G. S. Rapid and selective mobilization of specific stem cell types after consumption of a polyphenol-rich extract from sea buckthorn berries (*Hippophae*) in healthy human subjects. *Clinical interventions in aging* 2019 14, 253–263. doi:10.2147/CIA.S186893.
  13. Chen X., Zhi X., Yin Z., Li X., Qin L., Qiu Z., Su J. 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid Inhibits Osteoclastogenesis In Vivo and In Vitro by Blocking RANKL-Mediated RANK-TRAF6 Interactions and NF- $\kappa$ B and MAPK Signaling Pathways. *Frontiers in pharmacology* 2018, 9, 647. doi:10.3389/fphar.2018.00647.
  14. Vishvakarma N. K., Kumar A., Kant S, Bharti A. C., Singh S. M. Myelopotentiation effect of curcumin in tumor-bearing host: role of bone marrow resident macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012, 263(1), 111–21. doi: 10.1016/j.taap.2012.06.004.
  15. Fu Z., Chen X., Guan S., Yan Y., Lin H., Hua Z.-C. Curcumin inhibits angiogenesis and improves defective hematopoiesis induced by tumor-derived VEGF in tumor model through modulating VEGF-VEGFR2 signaling pathway. *Oncotarget* 2015, 6(23), 19469–19482. doi: 10.18632/oncotarget.3625.
  16. Chen X., Wang J., Fu Z., Zhu B., Wang J., Guan S., Hua Z. Curcumin activates DNA repair pathway in bone marrow to improve carboplatin-induced myelosuppression. *Scientific Reports* 2017, 7, 17724. doi:10.1038/s41598-017-16436-9.
  17. Mohammadi S., Ghaffari S. H., Shaiegan M., Zarif M. N., Nikbakht M., Akbari Birgani S., Alimoghadam K., Ghavamzadeh A. Acquired expression of osteopontin selectively promotes enrichment of leukemia stem cells through AKT/mTOR/PTEN/beta-catenin pathways in AML cells. *Life Sci.* 2016b, 152, 190–198.

## IMMUNOPOIESIS-MODULATING PROPERTIES OF BIOFLAVONOIDES ORIGINAL COMPLEX «EPIGENORM ANTIVIR»

© 2019 I. A. Goldina<sup>1\*</sup>, E. V. Markova<sup>1,2</sup>, I. A. Orlovskaya<sup>1</sup>,  
L. B. Toporkova<sup>1</sup>

\*E-mail: igoldina@mail.ru

<sup>1</sup>Federal state budgetary scientific institution “Scientific research institute of fundamental and clinical immunology”, Novosibirsk, Russia;

<sup>2</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Novosibirsk State Pedagogical University», Novosibirsk, Russia

Received: 14.05.2019. Accepted: 25.06.2019

Food plants bioflavonoids have chemoprotective and immunomodulatory properties, including the ability to affect the earliest stages of immunopoiesis, therefore the development of complex adjuvant therapeutic compositions on their basis is of undoubted relevance. The purpose of this study was to identify the immunopoiesis modulating and chemoprotective properties of the natural food polyphenols original complex “Epigenorm antivir”. As a result of the study, it was found that “Epigenorm antivir” increases the functional activity of bone marrow stem cells—the early common precursors of hematopoiesis, and also it has chemoprotective properties, the ability to increasing of the hematopoietic stem cell functional activity under the immunosuppression conditions.

*Key words:* bioflavonoids, hematopoietic stem cells, functional activity, immunosuppression

### Autors:

**Goldina I. A.**, ✉ researcher of the Neuroimmunology laboratory of the Federal State Budgetary Scientific Research Institute of the Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

630099, Novosibirsk, Institute of clinical and fundamental immunology, Phone: +79059368880, E-mail: igoldina@mail.ru

**Markova E. V.**, MD, Head of the Neuroimmunology laboratory, chief researcher of the Federal State Budgetary Scientific Research Institute of the Fundamental and Clinical Immunology; professor of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Novosibirsk State Pedagogical University», Novosibirsk, Russia;

**Orlovskaya I. A.**, MD, Professor, head of the Stem cell immunobiology laboratory of the Federal State Budgetary Scientific Research Institute of the Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

**Toporkova L. B.**, PhD, senior scientific researcher of the Stem cell immunobiology laboratory of the Federal State Budgetary Scientific Research Institute of the Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia.

## ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ CD127<sup>-</sup> И CD95<sup>+</sup> И ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА, ЭКСПОНИРОВАННЫХ ФЕНОЛОМ

© 2019 г. О. В. Долгих<sup>1,2,3\*</sup>, О. А. Казакова<sup>1</sup>, А. В. Кривцов<sup>1</sup>

\*E-mail: oleg@fcrisk.ru

<sup>1</sup>ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия;

<sup>2</sup>Пермский государственный научный исследовательский университет, Пермь, Россия;

<sup>3</sup>Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

Поступила: 29.05.2019. Принята: 30.06.2019

В работе представлены результаты иммунологического и генетического исследования крови женщин репродуктивного возраста постоянно проживающих в условиях аэрогенной экспозиции фенолом и имеющих в анамнезе репродуктивные нарушения, проявляющиеся в виде невынашивания беременности. Исследованы иммунологические показатели — экспрессия Т-регуляторных CD127<sup>-</sup> лимфоцитов, и экспрессия CD95<sup>+</sup> лимфоцитов вовлеченных в процесс апоптоза. Проанализирован генетический профиль женщин с установлением полиморфных вариантов генов *FOXP3* T3499C rs3761547 и *FAS* C14405T rs1159120 участвующих в экспрессии кластеров. Установлено, что женщины имеющие репродуктивные нарушения и подверженные повышенной контаминации биосред фенолом имеют сниженный уровень экспрессии Т-регуляторных клеток CD127<sup>-</sup> относительно здоровых не экспонированных женщин, и более низкий уровень экспрессии CD95<sup>+</sup> клеток как относительно группы неэкспонированных женщин, так и относительно нормы, что на фоне генетической полиморфности создает условия для злокачественного течения процессов репродуктивных нарушений (невынашивания беременности).

**Ключевые слова:** репродуктивные нарушения, фенол, CD лимфоциты, ген *FAS*, ген *FOXP3*

DOI: 10.31857/S102872210007240-9

**Адрес:** Пермь, ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Долгих Олег Владимирович. Тел.: +7 (342) 236-39-30. E-mail: oleg@fcrisk.ru

### Авторы:

**Долгих О. В.**, д.м.н., заведующий лабораторией иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федерального научного центра медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия;

**Казакова О. А.**, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ФБУН «Федерального научного центра медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия;

**Кривцов А. В.**, к.м.н., заведующий лабораторией иммуногенетики ФБУН «Федерального научного центра медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Сохранение женского репродуктивного здоровья приобретает особенную значимость в современных гигиенических и социально-экономических условиях, характеризующихся

повышенным уровнем опасности, как для развития женских репродуктивных органов, так и для развития беременности. Профилактика репродуктивных потерь неинфекционного генеза становится одним из приоритетных направлений, на фоне растущей заболеваемости репродуктивных органов в том числе в условиях техногенной экспозиции химическими факторами. Фенол относится ко 2-му классу опасности, поступает в объекты окружающей среды с пылегазовыми выбросами предприятий [1, 2, 4]

Органами мишенями фенола, при ингаляционном поступлении являются органы дыхания и сердечно-сосудистая система. При проникновении в клетку, фенол способен трансформироваться до более токсичных соединений, вызывающих повреждение ферментов и непосредственно ДНК. Экспозиция женщин вредными примесями, в том числе фенолом и его производными сопровождается нарушением

деятельности «критических» органов и систем (иммунитет, кровеносная система), что прямо или опосредованно влияет на способность выполнения репродуктивного потенциала, отягощенного негативной генетической полиморфностью кандидатных генов.

**Цель исследования** — изучить ассоциации полиморфного генетического профиля и уровней экспрессии CD лимфоцитов у женщин с репродуктивными нарушениями в условиях экспозиции фенолами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено обследование 129 женщин репродуктивного возраста ( $31,44 \pm 6,49$  лет) имеющих в анамнезе репродуктивные нарушения, проявляющиеся в виде невынашивания беременности. Все женщины постоянно проживают на территории, характеризующейся повышенной аэрогенной экспозицией фенолом и его производными превышающими нормативные уровни (более 1 ПДКс.с) [3].

Для исследуемых женщин проведено химическое, иммунологическое и генетическое тестирование на базе лабораторий ФБУН «Федерального научного центра медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» в г. Перми в период с 2013 по 2017 годы.

Уровень фенола в периферической крови пациентов определен методом капиллярной газовой хроматографии на приборе «Кристалл-5000» (Россия). Показатели клеточной дифференцировки T-регуляторных лимфоцитов CD127<sup>-</sup> и лимфоцитов вовлеченных в процесс апоптоза CD95 определялись на проточном цитометре FACSCalibur (США). Оценивались частоты полиморфных генов *FOXP3* T3499C rs3761547 и *FAS* C14405T rs1159120 регулирующих экспрессию соответственно CD127<sup>-</sup> и CD95 позитивных лимфоцитов на приборе BioRad CFX96 C1000 (Сингапур) в режиме реального времени.

Исследуемый контингент женщин был разделен на 4 группы: 1 группа — женщины с репродуктивными нарушениями, с содержанием фенола в пределах референтного диапазона ( $0-0,0016$  мг/см<sup>3</sup>), 2 группа — с содержанием фенола выше референтного диапазона ( $>0,0016$  мг/см<sup>3</sup>), 3 группа — условно здоровые, без репродуктивных нарушений, с содержанием фенола в пределах референтного диапазона и 4 группа — здоровые контаминированные фенолом выше референтного диапазона. Проведен ана-

лиз 6 парных сравнений показателей T-клеточного иммунитета между группами при помощи t-теста для выборочных средних, анализ средних относительно референтного значения при помощи одновыборочного t-теста. Проведен факторный дисперсионный анализ для условий наличия и отсутствия репродуктивных нарушений, одновременно — превышения референтного уровня фенола и отсутствие превышения. Факторный дисперсионный анализ связи уровня фенола (в пределах референтного диапазона/превышение референтного диапазона) и наличия репродуктивных нарушений (наличие/отсутствие) с имеющимся генетическим полиморфизмом кандидатных генов. Произведена оценка частот полиморфизмов генов на соответствие равновесию Харди-Вайнберга. Анализ средних исследуемых показателей относительно нормальных уровней представлен на диаграммах в виде  $\bar{x} \pm SE$  (Диаграммы 1–2). Значимыми считались результаты с уровнем  $p < 0,05$ . Для парных сравнений также использовалась поправка Бонферони, устанавливающая уровень значимости  $p < 0,008$  (менее 1%).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам оценки t-парного теста для независимых выборок установлены: между группами наблюдения (фенол выше нормы) ( $0,089 \pm 0,010 \times 10^9 / \text{дм}^3$  абсолютные лимфоциты,  $4,101 \pm 0,570\%$  относительные лимфоциты) и контроля (фенол в норме) ( $0,043 \pm 0,005 \times 10^9 / \text{дм}^3$  абсолютные лимфоциты,  $2,013 \pm 0,214\%$  относительные лимфоциты) значимые различия по показателю CD127<sup>-</sup> абсолютные и относительные лимфоциты  $p = 0,0015^{**}$  и  $p = 0,0009^{**}$  соответственно (\*\* — ниже, чем поправка Бонферони); между группами наблюдения (фенол в норме) и контроля (фенол в норме) также обнаружены значимые различия по показателю CD127<sup>-</sup> абсолютные и относительные лимфоциты  $p = 0,012$  ( $0,059 \pm 0,015 \times 10^9 / \text{дм}^3$  против  $0,089 \pm 0,010 \times 10^9 / \text{дм}^3$ ) и  $p = 0,002^{**}$  ( $2,140 \pm 0,533\%$  против  $4,101 \pm 0,570\%$ ) соответственно; между группами контроля (фенол в норме) и контроля (фенол выше нормы) значимые различия только по CD127<sup>-</sup> абсолютным лимфоцитам  $p = 0,044$  ( $0,089 \pm 0,010 \times 10^9 / \text{дм}^3$  против  $0,043 \pm 0,005 \times 10^9 / \text{дм}^3$ ); при сравнении групп наблюдения (фенол выше нормы) и контроля (фенол выше нормы), обнаружены значимые различия по показателю CD95<sup>+</sup> абсолютных лимфоцитов при  $p = 0,037$  ( $0,544 \pm 0,033 \times 10^9 / \text{дм}^3$  против  $0,713 \pm 0,049 \times 10^9 / \text{дм}^3$ ).

CD127<sup>-</sup> абсолютные и относительные лимфоциты

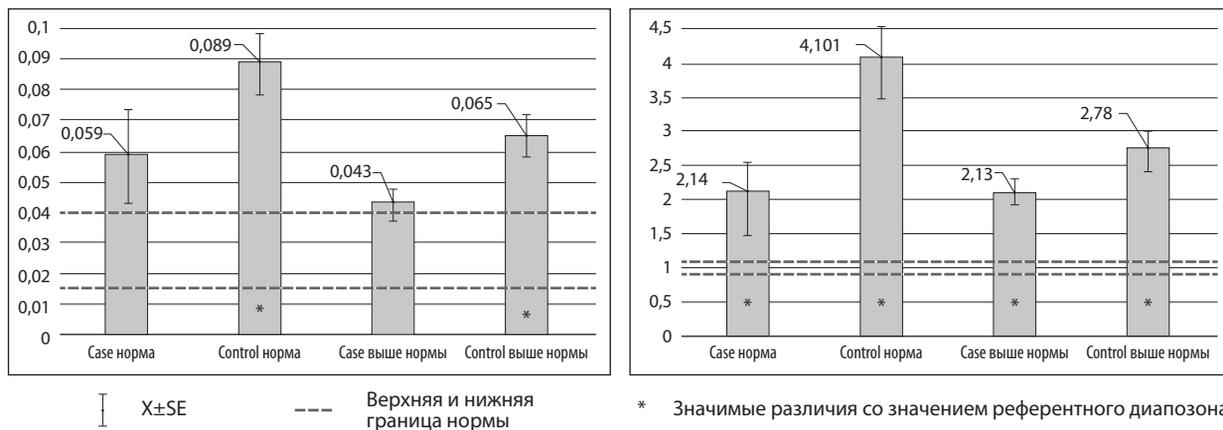


Диаграмма 1. Оценка экспрессии CD127<sup>-</sup> абсолютных (10<sup>9</sup>/дм<sup>3</sup>) и относительных лимфоцитов (%) для исследуемых групп

CD95<sup>+</sup> абсолютные и относительные лимфоциты

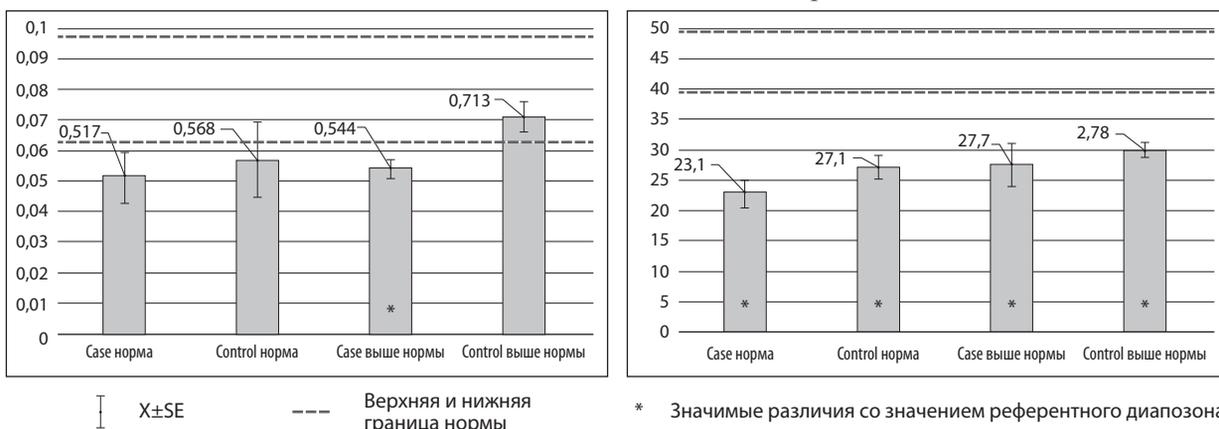


Диаграмма 2. Оценка экспрессии CD95<sup>+</sup> абсолютных (10<sup>9</sup>/дм<sup>3</sup>) и относительных лимфоцитов (%) для исследуемых групп

Распределение показателей соответствует нормальному распределению в соответствии с критерием Шапиро-Уилка при  $p < 0,05$ . При выполнении одновыборочного t-теста относительно референтного диапазона для исследуемых показателей установлены значимые различия (Диаграммы 1–2) при  $p < 0,005^*$

Проведение однофакторного дисперсионного анализа для фактора наличия и отсутствия репродуктивных нарушений выявил связь фактора с уровнями экспрессии T-клеточного звена иммунитета CD127<sup>-</sup> абсолютных лимфоцитов  $F(1;109) = 9,48, p = 0,002$  и относительных лимфоцитов  $F(1,109) = 10,29, p = 0,0018$ . Распределение частот генотипов исследуемых генов по группам соответствует равновесию Харди-Вайнберга.

Факторный дисперсионный анализ на поиск сочетанного действия уровня фенола и наличия

T/T гомозиготного варианта гена *FOXP3* установил связь факторов с уровнем экспрессии CD127<sup>-</sup> абсолютных лимфоцитов  $F(2,63) = 3,82, p = 0,027$ . Факторный анализ позволил обнаружить связь наличия репродуктивных нарушений при имеющемся C/T гетерозиготном полиморфизме гена *FAS* с уровнем экспрессии CD95<sup>+</sup>-относительных лимфоцитов  $F(2,63) = 4,59, p = 0,035$ .

## ВЫВОДЫ

Женщины, имеющие в анамнезе репродуктивные нарушения и подверженные высокому уровню контаминации биосред фенолом, характеризуются активацией экспрессии T-регуляторных CD4CD127<sup>-</sup> лимфоцитов относительно контрольной группы здоровых не экспонированных фенолами женщин. Также отмечается снижение

экспрессии вовлеченных в апоптоз CD3CD95<sup>+</sup> лимфоцитов как относительно контрольной группы, так и относительно референтного уровня, что ассоциируется с полиморфностью кандидатных генов (*FOXP3*, *FAS*), участвующих в регуляции экспрессии CD лимфоцитов.

Выявлена роль Т/Т гомозиготного варианта гена *FOXP3* в развитии повышенного уровня Т-клеточной супрессии CD127<sup>-</sup>, а также С/Т гетерозиготного варианта гена *FAS* в угнетении экспрессии CD95<sup>+</sup> относительных лимфоцитов, что на уровне транскрипта может характеризовать как проявления условий экспозиции фенолами.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зайцева Н. В., Устинова О. Ю., Землянова М. А. Оценка клиниколабораторных показателей здоровья работников предприятий по производству активированных углей // *Фундаментальные исследования*. 2010. № 11. С. 59–64. [Zaytseva N. V., Ustinova O. Yu., Zemlyanova M. A. Assessment the
2. Байравов Н. А., Жилияков Е. В. Антропогенная нагрузка как фактор, усугубляющий развитие и течение основных заболеваний беременных женщин и детей // *Фундаментальные исследования*. — № 4. — 2014. — С. 624–628. [Bayravov N. A., Zhilyakov E. V. Anthropogenic loading as the factor aggravating development and the course of the main diseases of pregnant women and children // *Basic researches*. — No. 4. — 2014. — P. 624-628.]
3. Автореферат диссертации на соискателя к.б.н. Предеиной Р. А. Гигиеническая оценка аэрогенного внешнесредового воздействия фенолов на иммунную регуляцию у детей (На примере Пермского края). — М, 2013. [The abstract of the thesis on the applicant to k. b. n. of Predeina R.A. Hygienic assessment of aerogenic externally environmental impact of phenols on immune regulation at children (On the example of Perm Krai). — М, 2013.]
4. Hansch C., McCarns S., Smith C., Dodittle D. Comparative QSAR evidence for a free-radical mechanism of phenol-induced toxicity. *Chem.Biol.Interact.* 2000, 127, 61.

## ASSESSMENT OF CD127<sup>-</sup> AND CD95<sup>+</sup> EXPRESSION AND GENETIC PROFILE OF WOMEN OF REPRODUCTIVE AGE EXPOSED TO PHENOL

© 2019 О. В. Dolgikh<sup>1,2,3\*</sup>, О. А. Kazakova<sup>1</sup>, А. В. Krivtsov<sup>1</sup>

\*E-mail: oleg@fcrisk.ru

<sup>1</sup>FBSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”, Perm, Russia;

<sup>2</sup>FSBEI HPE “Perm State National Research University”, Perm, Russia;

<sup>3</sup>FSBEI HPO “Perm State National Research Polytechnic University”, Perm, Russia

Received: 29.05.2019. Accepted: 30.06.2019

The paper presents the results of immunological and genetic blood studies of women of reproductive age living permanently under aerogenic exposure to phenol and having reproductive disorders as recurrent pregnancy loss. Immunological values — expression of T-regulatory CD127 lymphocytes and expression of CD95<sup>+</sup> lymphocytes involved in apoptosis were studied. The genetic profile of women was analyzed and the polymorphic variants of genes *FOXP3* T3499C rs3761547 and *FAS* C14405T rs1159120 participating in the expression of clusters were determined. It was found out that women having reproductive disorders and living under increased contamination of biological media with phenol have reduced level of expression of T-regulatory cells CD127 relative to healthy and unexposed women, and a lower level of CD95<sup>+</sup> cells relative to the unexposed women and the norms. It results in malignant course of processes of reproductive disorders (recurrent pregnancy loss).

*Key words:* reproductive disorders, phenol, CD lymphocytes, *FAS* gene, *FOXP3* gene

#### Authors:

**Dolgikh O. V.**, ✉ MD, Professor, Head of the Department of Immunobiological Methods of Diagnostics of FBSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”, Perm, Russia.

Perm, FBSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”.

Phone: +7 (342) 236-39-30. E-mail: oleg@fcrisk.ru;

**Kazakova O. A.**, postgraduate student, junior researcher of Immunogenetics Laboratory of FBSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”, Perm, Russia;

**Krivtsov A. V.**, Candidate of Medical Sciences, Head of Immunogenetics Laboratory of FBSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”, Perm, Russia.

## ИММУНОБИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ДЕТСКОГО НАСЕЛЕНИЯ ЮГА СИБИРИ

© 2019 г. О. В. Долгих<sup>1,2,3\*</sup>, А. А. Мазунина<sup>1</sup>, А. В. Кривцов<sup>1</sup>,  
М. А. Гусельников<sup>1</sup>

\*E-mail: oleg@fcrisk.ru

<sup>1</sup>ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», Пермь, Россия

Поступила: 18.05.2019. Принята: 26.06.2019

Проведен анализ особенностей иммунорегуляторных и биохимических показателей детского населения, проживающего в зоне аэрогенного загрязнения алюминием. По результатам исследований состояния здоровья детского населения выявлено наличие ранних изменений со стороны иммунной системы, которые проявляются в повышении содержания специфических иммуноглобулинов G к алюминию ( $p < 0,05$ ). Изучена сравнительная полиморфность гена *eNOS* (rs1799983). Установлена избыточная частотность аллеля T гена *eNOS* (rs1799983), что в условиях техногенной «алюминиевой» провинции может обуславливать возникновение заболеваний сердечно-сосудистой системы у детей.

**Ключевые слова:** алюминий, детское население, полиморфизм гена *eNOS*, риск, заболевания сердечно-сосудистой системы

DOI: 10.31857/S102872210007241-0

Адрес: Пермь, ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Долгих Олег Владимирович.  
Тел.: +7 (342) 236-39-30. E-mail: oleg@fcrisk.ru

Авторы:

Долгих О. В., профессор, доктор медицинских наук, заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», Пермь, Россия;

Мазунина А. А., младший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», Пермь, Россия;

Кривцов А. В., кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией иммуногенетики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», Пермь, Россия;

Гусельников М. А., аспирант ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», Пермь, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Антропогенное изменение окружающей среды приводит, как известно, к увеличению риска здоровью населения. Характер отклика на воздействие окружающей среды зависит не только от специфики факторов, уров-

ня экспозиции, но и от наследственных, генетических особенностей организма [1].

На территории Иркутской области расположены крупнейшие предприятия теплоэнергетики, переработки нефти, цветной металлургии, химической и нефтехимической, лесной, деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной, легкой и пищевой промышленности, которые определяют количественный и качественный состав выбрасываемых загрязняющих веществ в атмосферу. В семи промышленных городах области уровень загрязнения атмосферного воздуха в период 2016–2017 гг. оценивается как высокий и очень высокий [2].

Алюминий относится к иммуно- и генотоксичным элементам. Он кумулируется и подавляет функцию макрофагов, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов. При этом алюминий вызывает не только супрессию клеточных реакций, но и митогенный эффект лимфоцитов. Предполагают,

что алюминий может быть одной из причин старческого клеточного иммунодефицита. Кроме того, алюминий может вызывать аллергию, что обусловлено супрессивным влиянием этого микроэлемента на мутаген-опосредованный иммунный ответ. В то же время алюминий способствует обострению целого ряда аутоиммунных заболеваний в пожилом и старческом возрасте [9].

**Цель.** Изучить особенности индикаторных показателей иммунной регуляции и полиморфизма генов у детей, выявить риски заболеваний детского населения Сибири в условиях внешнесредового аэрогенного воздействия алюминия.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На территории юга Сибири (Иркутская область) обследовано 332 ребенка в возрасте от 4 до 9 лет – далее группа наблюдения, «случай». На территории Красноярского края обследовано 90 детей в возрасте от 5 до 8 лет – далее группа сравнения, «контроли». Группы сопоставимы по этническому, гендерному и возрастному составу, социальному статусу.

У всех обследуемых проведено химическое, биохимическое и генетическое тестирование.

Химико-аналитическое исследование на содержание алюминия в биосредах методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на масс-спектрометре Agilent 7500cx («Agilent Technologies Inc.», США) в соответствии с МУК 4.1.3230–14 «Измерение массовых концентраций химических элементов в биосредах (кровь, моча) методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой» [4].

Изменение содержания специфического к алюминию иммуноглобулина класса G (IgG) определяли в аллергосорбентном тесте с ферментной меткой. Определение содержания оксида азота, фактора эндотелия сосудов (VEGF) и интерлейкина-17 (IL-17) проводили методом иммуноферментного анализа.

У всех обследуемых был изучен полиморфизм однонуклеотидных замен (SNP) генов эндотелиальной синтазы оксида азота *eNOS*, интер-

лейкина-17 *IL17F* и фактора эндотелия сосудов *VEGFA*. Генетический материал был выделен из периферической крови сорбентным методом. Для определения полиморфизма исследуемых генов использовали тест-системы «Синтол», Россия – набор реагентов для определения полиморфизма Glu298Asp гена *eNOS* (rs1799983), набор реагентов для определения полиморфизма C/G гена *IL17F* (rs 612242) и реагентов для определения полиморфизма G634C гена *VEGFA* (rs 2010963).

Оценка генетического полиморфизма осуществлялась методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на приборе BioRAD CFX96™ Real-Time System (США) с последующей детекцией продуктов реакции методом аллельной дискриминации.

Расчет распределения частот генотипов и аллелей в группах проводился с помощью Online-программы «Ген Эксперт», используемой для расчета статистических параметров для исследований «случай-контроль», использующих SNP (диагностику однонуклеотидных полиморфизмов).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Химико-аналитический анализ биосред показал, что у наблюдаемой группы детей достоверно повышено содержание алюминия в моче по отношению к группе сравнения в 1,7 раз ( $p < 0,05$ ) (Таблица 1).

По результатам иммунобиохимического анализа крови детей установлено, что содержание специфического иммуноглобулина G к алюминию у группы наблюдения выше референтного значения в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ), у группы сравнения – в 2,3 раза ( $p < 0,05$ ) (Таблица 2).

Также было выявлено снижение уровня оксида азота у группы наблюдения в 1,25 раз относительно группы сравнения ( $p < 0,05$ ) (Таблица 2).

К ключевым полиморфизмам, реализующим взаимодействие антропогенных химических факторов и процессов иммунологического гомеостаза, относится полиморфизм Glu298Asp

**Таблица 1.** Сравнительная оценка содержания алюминия в биосредах

Показатель	Референтное значение, мкг/см <sup>3</sup> (по Тицу)	Группа наблюдения, (n=332) M±m	Группа сравнения, (n=90) M±m
Алюминий [моча], мг/дм <sup>3</sup>	0–0,007	0,0212±0,0029*	0,0122±0,0042

**Примечание:** \* -разница достоверна относительно группы сравнения ( $p < 0,05$ )

**Таблица 2.** Иммунобиохимические показатели детского населения экспонированного алюминием

Показатель	Референтное значение	Группа наблюдения, (n=332) M±m	Группа сравнения, (n=90) M±m
IgG к алюминию, у.е.	0–0,1	0,159±0,02*/**	0,233±0,03
Оксид азота, мкмоль/дм <sup>3</sup>	39–116,8	64,41±4,873**	80,514±14,995
VEGF, пг/мл	10–700	143,92±32,954	175,066±28,564
Интерлейкин-17, пг/мл	0–5	6,68±1,775	4,68±1,775

**Примечание:** \* - разница достоверна относительно референтного значения ( $p < 0,05$ ); \*\* - разница достоверна относительно группы сравнения ( $p < 0,05$ )

**Таблица 3.** Мультипликативная модель наследования (тест хи-квадрат,  $df=1$ ) по гену *eNOS*

Аллели	Случаи n=332	Контроли n=90	$\chi^2$	p	OR	
					знач.	95% CI
Аллель G	0,827	0,717	10,87	0,001	1,89	1,29–2,76
Аллель T	0,173	0,283			0,53	0,36–0,78

**Таблица 4.** Аддитивная модель наследования (тест Кохрана-Армитаджа для линейных трендов,  $\chi^2=[0,1,2]$ ,  $df=1$ ) по гену *eNOS*

Генотипы	Случаи n=332	Контроли n=90	$\chi^2$	p	OR	
					знач.	95% CI
Генотип G/G	0,696	0,533	9,88	0,002	2,00	1,24–3,22
Генотип G/T	0,262	0,367			0,61	0,37–1,00
Генотип T/T	0,042	0,100			0,40	0,17–0,95

патогенетического гена эндотелиальной NO-синтазы (*eNOS*) [3].

По результатам генотипирования установлено, что «случаи» и «контроли» в анализируемых выборках детского населения Иркутской области и Красноярского края находятся в равновесии по критерию Харди-Вайнберга для гена *eNOS* ( $p=0,12$  для «случаев»;  $p=0,36$  для «контролей»), в таком случае исследуемые генетические различия у населения двух регионов могут быть проанализированы с применением как мультипликативной так и аддитивной моделей.

По результатам анализа полиморфизма генов детского населения отмечается достоверное ( $p < 0,05$ ) различие G-аллеля и T-аллеля (Таблица 3) и различие по генотипам (Таблица 4) гена эндотелиальной NO-синтазы (*eNOS*) между группами различных территорий.

Установлено, что достоверность различия двух выборок детского населения по *eNOS* (rs1799983) формирует частотность генотипов G/G и T/T.

Следует отметить, что при обработке данных по генам *IL17F* и *VEGFA* результаты не соответствовали равновесию Харди-Вайнберга.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Продукт экспрессии гена *eNOS* фермент – эндотелиальная NO-синтаза, ответственный за синтез в сосудистой стенке оксида азота – важнейшего вазодилатора, антиагреганта, антимиотгена и антиоксиданта [14]. Наличие T-аллеля определяет высокий риск развития сердечно-сосудистых заболеваний: ишемической болезни сердца [12], стенокардии, инфаркта миокарда [7], артериальной гипертензии [5], атеросклероза [10], лакунарного инсульта [8], ишемического инсульта [11], венозной тромбоэмболии [15], ревматоидного артрита [13].

Кроме этого, одной из основных функций сосудистого эндотелия в организме является участие в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета. Эндотелиоциты способны исполнять роль антигенпредставляющих клеток,

экспрессируя на своей поверхности антигены, представлять их Т-лимфоцитам и секретировать интерлейкин-1 [6], что предполагает генетическую предрасположенность к развитию заболеваний сердечно-сосудистой системы у населения юга Сибири.

## ВЫВОДЫ

По результатам исследований состояния иммунитета и полиморфизма генов детского населения, проживающего в зоне аэрогенного загрязнения алюминием, выявлено наличие ранних изменений иммунного статуса, которые проявляются в повышении содержания специфических иммуноглобулинов G к алюминию ( $p < 0,05$ ). По результатам изучения генетического полиморфизма двух регионов юга Сибири было установлено, что у детского населения экспонированной алюминием территории наблюдаются достоверные различия по встречаемости аллелей и генотипов для гена *eNOS* (Glu298Asp, rs1799983) генотипы *G/G* и *T/T* и характеризуется достоверным снижением экспрессии оксида азота у группы наблюдения на 25% относительно группы сравнения ( $p < 0,05$ ), что указывает на раннюю реализацию предрасположенности к развитию патологии сердечно-сосудистой системы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Долгих В. В., Рычкова Л. В., Мандзяк Т. В., Маторова Н. И., Сахипова Г. Р., Давыдов А. В. Особенности физического развития и состояния здоровья детей дошкольного и младшего школьного возраста в зависимости от уровня артериального давления в промышленных центрах Иркутской области // Acta Biomedica Scientifica. 2006. № 3 (49). С. 191–193. [Dolgikh V. V., Rychkova L. V., Mandzyak T. V., Matorova N. I., Sakhipova G. R., Davydov A. V. Features of physical development and health status of children of preschool and primary school age, depending on the level of blood pressure in the industrial centers of the Irkutsk region // Acta Biomedica Scientifica. 2006. № 3 (49). p.191–193.]
2. Государственный доклад о состоянии и об охране окружающей среды Иркутской области в 2016 году. – Министерство природных ресурсов и экологии Иркутской области. – Иркутск, 2017. [State report on the state and environmental protection of the Irkutsk region in 2016. – The Ministry of Natural Resources and Ecology of the Irkutsk Region. – Irkutsk, 2017.]
3. Долгих О. В., Кривцов А. В., Бубнова О. А., Горшкова К. Г., Дианова Д. Г., Вдовина Н. А., Пирогова Е. А., Безденежных В. А. Особенности генетического полиморфизма и иммунного статуса у детей, экспонированных бенз(а)пиреном // Вестник Пермского университета. Серия: биология. 2014. Вып. 4. С. 97–100. [Dolgikh O. V., Krivtsov A. V., Bubnova O. A., Gorshkova K. G., Dianova D. G., Vdovina N. A., Pirogova E. A., Bezdenezhnykh V. A. Features of genetic polymorphism and immune status in children exposed to benzo (a) pyrene // Perm University Bulletin. Series: biology. 2014. Issue 4. P. 97–100.]
4. Измерение массовых концентраций химических элементов в биосредах (кровь, моча) методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой [Электронный ресурс]. – МУК 4.1.3230–14. [Measurement of mass concentrations of chemical elements in biological media (blood, urine) by mass spectrometry with inductively coupled plasma [Electronic resource]. – МУК 4.1.3230–14.]
5. Кузнецова Т. Ю. и др. Влияние полиморфизма Glu298Asp гена эндотелиальной NO-синтазы на развитие поражений органов-мишеней при установлении артериальной гипертензии в молодом возрасте // Сибирский медицинский журнал. 2010. Vol. 25. № 2–1. [Kuznetsova T. Yu. and others. Influence of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial NO synthase gene on the development of target organ lesions in establishing arterial hypertension at a young age // Siberian Medical Journal. 2010. Vol. 25. No. 2–1.]
6. Локтионова И. Л., Покровский М. В., Рагулина В. А., Титарева Л. В., Денисюк Т. А., Ступакова Е. В., Сытник М. В., Сароян К. В., Лосенок С. А. Состояние функции сосудистого эндотелия при инфекционной патологии различной этиологии // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2012. № 4 (123), вып. 17/1. С. 20–31. [Loktionova I. L., Pokrovsky M. V., Ragulina V. A., Titareva L. V., Denisjuk T. A., Stupakova E. V., Sytnik M. V., Saroyan K. V., Losenok S. A. The state of the function of the vascular endothelium in infectious diseases of various etiologies // Scientific Gazette of Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacy. 2012. № 4 (123), vol. 17/1. P. 20–31.]
7. Поздняков Н. О., Мирошников А. Е., Поздняков С. О. К вопросу о клиническом значении полиморфизмов генов *eNOS* и *AGTR2* у пациентов с инфарктом миокарда, стабильной и нестабильной формами стенокардии // Universum: медицина и фармакология. 2016. № 1–2. P. 24. [Pozdnyakov N. O., Miroshnikov A. E., Pozdnyakov S. O. On the issue of the clinical significance of *eNOS* and *AGTR2* gene polymorphisms in patients with myocardial infarction, stable and unstable forms of angina pectoris // Universum: medicine and pharmacology. 2016. No. 1–2. P. 24.]
8. Топузова М. П. и др. Дисфункция эндотелия у больных с лакунарным инсультом // Лечение и профилактика. 2013. № 3. С. 37–45. [Topuzova M. P. and others. Endothelial dysfunction in patients with lacunar stroke // Treatment and prevention. 2013. No. 3. pp. 37–45.]

9. Шугалей И. В., Гарабаджиу А. В., Илюшин М. А., Судариков А. М. Некоторые аспекты влияния алюминия и его соединений на живые организмы // Экологическая химия. 2012. Т. 21, № 3. С. 172–186. [Shugaley I. V., Garabadzhi A. V., Ilyushin M. A., Sudarikov A. M. Some aspects of the influence of aluminum and its compounds on living organisms // Ecological chemistry. 2012. Vol. 21, No. 3. P. 172–186.]
10. Campedelli F. L. et al. Polymorphism of the gene eNOS G894T (Glu298Asp) in symptomatic patients with atherosclerosis // Genetics and molecular research: GMR. 2017. Vol. 16. № 2.
11. Kumar A. et al. Association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of ischemic stroke: A meta-analysis // Neurology India. 2017. Vol. 65. № 1. P. 22.
12. Mahmoodi K. et al. Association of nitric oxide levels and endothelial nitric oxide synthase G894T polymorphism with coronary artery disease in the Iranian population // Vascular specialist international. 2016. Vol. 32. № 3. P. 105.
13. Pehlivan S. et al. The functional variants of endothelial nitric oxide synthase gene associated with rheumatoid arthritis in Turkish adults // Clinical rheumatology. 2016. Vol. 36 (3). P. 537–540.
14. Tenero L., Piazza M., Zannoni L. et al. Antioxidant supplementation and exhaled nitric oxide in children with asthma // Allergy and asthma proceedings. 2016. Vol. 37. P. 8–13.
15. Zhao L. et al. Risk indicators for venous thrombosis in first-degree relatives of patients with recurrent venous thromboembolism in Chinese // Medicine. 2016. Vol. 95. № 41.

## IMMUNOBIOCHEMICAL INDICATORS AND COMPARATIVE EVALUATION OF POLYMORPHISM OF CHILDREN'S POPULATION GENES IN SOUTH SIBERIA

© 2019 O. V. Dolgikh<sup>1,2,3\*</sup>, A. A. Mazunina<sup>1</sup>, A. V. Krivtsov<sup>1</sup>,  
M. A. Guselnikov<sup>1</sup>

\*E-mail: oleg@fcrisk.ru

<sup>1</sup>FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk  
Management Technologies", Perm, Russia;

<sup>2</sup>Perm State National Research University, Perm, Russia;

<sup>3</sup>Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia

**Received:** 18.05.2019. **Accepted:** 26.06.2019

The analysis of the features of immunoregulatory indicators of the child population living in the zone of airborne aluminum pollution was carried out. According to the results of immunological studies of the health of the child population, the presence of pathological changes in the immune system was revealed, which are manifested in a decrease in the phagocytic activity of cells, an increase in the level of the main classes of immunoglobulins, activation of T cell receptors CD127<sup>-</sup>, an increase in the content of cell death receptor CD95<sup>+</sup> (p<0,05). The comparative polymorphism of the eNOS gene (rs1799983) was studied. The excessive frequency of the T allele of the eNOS gene (rs1799983) was established, which, under the conditions of the technogenic "aluminum" province, can cause the occurrence of diseases of the cardiovascular system in children.

*Key words:* aluminum, children population, eNOS gene polymorphism, risk, diseases of the cardiovascular system

### Authors:

**Dolgikh O. V.**, ✉ MD, Professor, Head of the Department of Immunobiological Methods of Diagnostics of FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies", Perm, Russia.

Perm, FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies".

Phone: +7 (342) 236-39-30. **E-mail:** oleg@fcrisk.ru;

**Mazunina A. A.**, Junior Researcher of the Immunogenetics Laboratory of the Department of Immunobiological Methods of Diagnostics of FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies", Perm, Russia;

**Krivtsov A. V.**, Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Immunogenetics of FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies", Perm, Russia;

**Guselnikov M. A.**, postgraduate student of FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies", Perm, Russia.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЛИЯНИЯ ЗАМЕЩЕННЫХ 1,3,4-6Н-ТИАДИЗИНОВ НА ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

© 2019 г. В. В. Емельянов<sup>2\*</sup>, И. Г. Данилова<sup>1,2,3</sup>, С. А. Бриллиант<sup>1,3</sup>,  
И. Ф. Гетте<sup>1</sup>, Л. П. Сидорова<sup>2</sup>, Т. А. Цейтлер<sup>2</sup>, Ю. Н. Клюева<sup>2</sup>

\*E-mail: v.v.emelianov@urfu.ru

<sup>1</sup>ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России  
Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

<sup>3</sup>ГАУЗ СО Институт медицинский клеточных технологий, Екатеринбург, Россия

Поступила: 18.05.2019. Принята: 26.06.2019

В статье изложены данные о влиянии замещенных 1,3,4-тиадиазин (L-14, L-17) на изменение гематологических показателей крыс с аллоксановым диабетом. Особый интерес представляет изучение гематологических показателей крыс при развитии аллоксанового сахарного диабета и возможности его коррекции соединениями из ряда замещенных 1,3,4-тиадиазин.

**Ключевые слова:** периферическая кровь, аллоксановый диабет, 2-аминопропилморфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин, дигидробромид (L-14), 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин гидробромид (L-17)

DOI: 10.31857/S102872210007242-1

Адрес: 620002 г. Екатеринбург, ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Емельянов Виктор Владимирович.

Тел.: +79221004352. E-mail: v.v.emelianov@urfu.ru

### Авторы:

**Емельянов В. В.**, к.м.н., доцент кафедры иммунохимии, доцент кафедры медицинской биохимии и биофизики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия;

**Данилова И. Г.**, д.б.н., заведующая лабораторией биохимии и морфологии ФГБУН ИИФ УрО РАН, зав. кафедрой медицинской биохимии и биофизики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», г.н.с. ЦЭЛБ ГАУЗ СО ИМКТ, Екатеринбург, Россия;

**Бриллиант С. А.**, м.н.с. лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН ИИФ УрО РАН, н.с. ЦЭЛБ ГАУЗ СО ИМКТ Екатеринбург, Россия;

**Гетте И. Ф.**, к.б.н., с.н.с. лаборатории биохимии и морфологии ИИФ УрО РАН Екатеринбург, Россия;

**Сидорова Л. П.**, к.х.н., доцент кафедры безопасности жизнедеятельности ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б. Н. Ельцина» Екатеринбург, Россия;

**Цейтлер Т. А.**, к.х.н., м.н.с. кафедры органической и биомолекулярной химии ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б. Н. Ельцина» Екатеринбург, Россия;

**Клюева Ю. Н.**, ассистент кафедры медицинской биохимии и биофизики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный уни-

верситет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина Екатеринбург, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Синтетические 1,3,4-6Н-тиадиазины, отличающиеся природой заместителей в положениях 2- и 5-тиадиазинового цикла, представляют собой перспективный в отношении фармакологической активности класс органических соединений. Получены представители этого класса с уникальным комплексом гипотермического и гипометаболического действия, антиагрегантным и противовоспалительным эффектами, антистрессорными свойствами [1, 2]. Раскрытие и сужение 1,3,4-тиадиазинового кольца с образованием тиольных производных [3] имеет значение в проявлении ими антиоксидантной активности.

В проведенных ранее исследованиях показана способность 2-аминопропилморфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазина, дигидробромид (соединение L-14) и 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазина, гидробромид (соединение L-17),

корректировать метаболические нарушения (гипергликемию, оксидативный стресс и активацию гликирования белков) при экспериментальном аллоксановом сахарном диабете [4]. Соединение L-17 также показало способность в этих условиях корректировать гипоинсулинемию, уровни про- и противовоспалительных цитокинов в крови [5].

Дальнейшее развитие исследований противодиабетической активности замещенных 1,3,4-6H-тиадиазинов предполагает обязательную оценку гематологических показателей для исключения их миелотоксического действия. В наших предыдущих исследованиях было установлено корректирующее влияние соединения L-17 на картину периферической крови при развитии аллоксанового сахарного диабета у крыс [6]. Представляет интерес выяснить, специфичен ли данный эффект для одного соединения, или же он характерен и для других замещенных 1,3,4-6H-тиадиазинов.

**Целью** настоящего исследования являлась сравнительная оценка влияния соединений L-14 и L-17 из ряда замещенных 1,3,4-6H-тиадиазинов, на гематологические показатели крыс с аллоксановым сахарным диабетом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на крысах линии Вистар массой 250–300 г. Содержание и выведение животных из эксперимента выполняли с соблюдением этических норм и правил, описанных Международным Советом Медицинских Научных обществ (CIOMS) в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), а также в соответствии приказу Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Экспериментальных животных делили на 5 групп (n=50). 1 – интактная группа (n=10). 2 – крысы, которым вводили физиологический раствор (n=10). 3 – группа животных, которым моделировали аллоксановый сахарный диабет (n=10). 4 – крысы с аллоксановым сахарным диабетом, которым вводили соединение L-14 (n=10) и 5 – крысы с аллоксановым сахарным диабетом, которым вводили соединение L-17 (n=10).

Моделирование аллоксанового сахарного диабета длительностью 30 сут (СД30) у крыс осуществляли согласно следующей методике [7]. 2-аминопропилморфолино-5-фенил-6H-1,3,4-тиадиазин, дигидробромид (соединение L-14)

и 2-морфолино-5-фенил-6H-1,3,4-тиадиазин, гидробромид (соединение L-17) был синтезирован по методу [8] на кафедре органической и биомолекулярной химии химико-технологического института УрФУ под руководством академика РАН О. Н. Чупахина. Одновременно с индукцией СД вводили внутримышечно крысам соединения L-14 и L-17 в фармакологической дозе 40 мг/кг массы животного с периодичностью 3 раза в неделю в течение 4 недель. Животных выводили из эксперимента путем передозировки эфирного наркоза спустя 30 суток.

Для анализа периферической крови совершали забор крови из хвостовой вены крысы. Измерения образцов крови осуществляли с помощью гематологического анализатора Celly 70 фирмы Biocode-Nucel (Франция), предназначенного для ветеринарии и адаптированного к гематологическим исследованиям на животных.

Аналогично исследованию [6], для верификации развития аллоксанового диабета у крыс определяли концентрации глюкозы, инсулина и гликированного гемоглобина. Концентрацию глюкозы в плазме крови животных определяли глюкозооксидазным методом наборами реагентов «Новоглюк-КМ», («Вектор-Бест», Россия), содержание инсулина – иммуноферментным методом Insulin ELISA (Швеция). Содержание гликированного гемоглобина оценивали в цельной крови методом гель-хроматографии «Диабет-тест» («Фосфосорб», Россия). Биохимические исследования выполняли на спектрофотометре DU-800 фирмы Beckman Coulter (США).

Статистическую обработку данных проводили в программном пакете «Statistica 8.0». Данные представлены в виде среднего арифметического и его стандартной ошибки ( $M \pm m$ ). Сравнение групп выполняли с использованием критерия Манна-Уитни (U). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При сопоставлении результатов гематологических и биохимических исследований животных контрольной группы (1) с введением физиологического раствора и интактной группы (2) не было отмечено статистически значимых различий. На основании этого, дальнейшее сравнение полученных экспериментальных данных – групп 3, 4 и 5 осуществляли только с группой 1 (интактных животных).

Спустя 30 суток после введения аллоксана у животных наблюдалась картина выраженных

метаболических нарушений, характерных для сахарного диабета. Это выразилось статистически значимым увеличением уровня глюкозы на 361% и гликированного гемоглобина на 39% на фоне снижения концентрации инсулина на 65% (Таблица 1).

При моделировании аллоксанового СД длительностью 30 суток значимого изменения содержания эритроцитов и концентрации гемоглобина в периферической крови животных отмечено не было. Изменения выражались лишь в увеличении средней концентрации гемоглобина в эритроците (МСНС) и показателя ширины распределения эритроцитов (RDW) по сравнению с группой интактных животных. Нарастание анизоцитоза и появление аномальных форм эритроцитов при моделировании аллоксанового СД было показано нами ранее при исследовании их методом атомно-силовой микроскопии [9]. Исследованные соединения оказали неодинаковое влияние на показатели красной крови. При введении соединения L-14 отмечали возрастание показателя анизоцитоза (RDW), а также среднего объема эритроцита (MCV), среднего содержания (MCH) и средней концентрации гемоглобина в эритроците (МСНС), что говорит о неоднородности популяции красных клеток крови и тенденции к их гиперхромии. MCV и MCH были на 8% выше при введении L-17 по сравнению с введением L-14 (Таблица 2). В отличие от введения соединения L-14, при введении

соединения L-17 крысам с СД30 наблюдали достоверное увеличение количества гемоглобина (Hb), а показатели МСНС и RDW не отличались от группы интактных животных. Это свидетельствует о преимущественной возможности соединения L-17 корректировать в состояние красной крови при аллоксановом сахарном диабете и может служить косвенным признаком активации эритропоэза (Таблица 2).

Исследуя показатели белой крови, в группе с СД30 зарегистрировали статистически значимое снижение содержания лейкоцитов на 12%, в сравнении с группой интактных животных, преимущественно за счет гранулоцитов. Остальные показатели белой крови при моделировании аллоксанового диабета длительностью 30 сут достоверно не изменялись. Корректирующее действие соединений L-14 и L-17 на состояние белой крови отличалось (Таблица 3). На фоне введения L-17 мы наблюдали статистически значимое снижение общего количества лейкоцитов на 35% за счет снижения числа гранулоцитов (Г/л) на 53%. Напротив, введение соединения L-14 позволило увеличить содержание гранулоцитов, которое превышало на 85% соответствующее значение в группе с введением L-17. Это отразилось и в более высоком содержании лейкоцитов в группе с введением соединения L-14 (на 45% выше, чем при введении L-14), которое соответствовало содержанию лейкоцитов у интактных животных.

**Таблица 1.** Изменение биохимических показателей крови крыс при СД30

Показатели	Глюкоза, ммоль/л	Инсулин, мкг/л	Гликированный гемоглобин, %
Интактная группа	6,0±0,3	1,28±0,19	5,1±0,2
СД30	27,8±3,5*	0,45±0,07*	7,1±0,6*

**Примечание:** \* – достоверные различия от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 2.** Изменение показателей красной крови крыс с СД30 и при введении L-14, L-17

	RBC, Т/л	Hb, г/дл	Hct, %	MCV, фл	MCH, пг	МСНС, г/дл	RDW, %
Интактная группа	8,38±0,27	14,06±0,2	42,03±0,76	48,63±4,33	16,51±0,45	34,7±0,49	15,76±0,41
СД30	8,34±0,28	14,24±0,39	39,25±1,27	47,11±0,51	17,13±0,29	36,37±0,51*	16,81±0,24*
СД30+L-14	9,21±0,33	14,34±0,67	42,78±1,61	46,47±0,76	<b>15,57±0,41<sup>^</sup></b>	<b>33,49±0,45<sup>^</sup></b>	<b>17,25±0,31*</b>
СД30+L-17	8,74±0,2	15,24±0,45*	45,0±1,29	<b>51,44±0,62<sup>#,&amp;</sup></b>	<b>17,8±0,13<sup>*,&amp;</sup></b>	33,86±0,51 <sup>#</sup>	16,62±0,16

**Примечание:** в табл. 2–4 статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) \* – с группой интактных животных; <sup>^</sup> – между группами СД30 и СД30+L-14; <sup>#</sup> – между группами СД30 и СД30+L-17; & – между группами СД30+L-14 и СД30+L-17.

**Таблица 3.** Изменение показателей белой крови крыс с СД30 и при введении L-14, L-17

	WBC, Г/л	Lym, Г/л	Mid, Г/л	Grn, Г/л	Lym,%	Mid,%	Grn,%
Интактная группа	10,76±0,79	5,0±0,74	0,81±0,27	5,18±0,84	45,9±4,81	8,9±3,25	46,0±7,14
СД30	8,48±0,53*	4,64±0,49	0,73±0,17	3,1±0,53	55,36±4,1	8,36±1,88	36,27±2,14
СД30+L-14	10,12±1,03	4,47±0,51	1,05±0,15	4,6±0,61	<b>44,57±2,56<sup>^</sup></b>	10,71±1,42	<b>44,71±3,41<sup>^</sup></b>
СД30+L-17	7,0±1,42*	3,8±0,8	0,72±0,16	<b>2,48±0,45*.&amp;</b>	<b>53,4±2,15<sup>&amp;</sup></b>	10,0±0,71	36,6±2,8

**Таблица 4.** Изменение показателей тромбоцитарного звена крови крыс с СД30 и при введении L-14, L-17

	Plt, Г/л	Pct,%	MPV, фл	PDW,%
Интактная группа	665,18±32,86	0,46±0,02	6,71±0,06	11,08±0,13
СД30	548,36 ±35,1*	0,33±0,02*	6,14±0,07*	11,2±0,12
СД30+L-14	<b>1016±129,53*.<sup>^</sup></b>	<b>0,66±0,08*.<sup>^</sup></b>	<b>6,58±0,07<sup>^</sup></b>	11,22±0,22
СД30+L-17	<b>538,6±38,45*.&amp;</b>	<b>0,35±0,1<sup>&amp;</sup></b>	6,8±0,18*. <sup>#</sup>	<b>12,16±0,11*.<sup>#.&amp;</sup></b>

Со стороны тромбоцитарного звена в группе СД30 наблюдали снижение общего числа тромбоцитов (Plt), тромбокриты (Pct) и среднего объема тромбоцитов (MPV) по сравнению с интактными животными. При введении соединения L-14 отмечали рост общего числа тромбоцитов (Plt) и тромбокриты (Pct) более чем в 2 раза по сравнению с введением L-17. Это может быть связано с ускорением дифференцировки клеток мегакариоцитарного ряда в костном мозге, и последующим их выходом в кровоток для восполнения популяции циркулирующих тромбоцитов. Напротив, при введении соединения L-17 отмечали уменьшение общего числа тромбоцитов в сравнении с интактной группой. MPV и показатель анизоцитоза тромбоцитов (PDW) достоверно увеличивались при введении соединения L-17 по сравнению с интактными животными и группой СД30 (Таблица 4).

### ВЫВОДЫ:

1. Введение животным соединения L-14 при развитии аллоксанового сахарного диабета у крыс лучше корригировало содержание лейкоцитов за счет восстановления уровня гранулоцитов периферической крови, но в большей мере способствовало анизоцитозу, макроцитозу и гиперхромии эритроцитов, вызывало тромбоцитоз.

2. Введение соединения L-17, напротив, преимущественно корригировало измененные показатели красной крови (увеличение концен-

трации гемоглобина, нормализация среднего содержания гемоглобина в эритроците и показателя анизоцитоза), увеличивало средний объем и показатель анизоцитоза тромбоцитов.

3. Исследованные соединения L-14 и L-17, представители ряда замещенных 1,3,4-6H-тиадиазинов, обладают различиями в корригирующем действии на показатели периферической крови крыс при аллоксановом сахарном диабете.

Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 16-15-00039П) и государственного бюджетного финансирования, тема № АААА-А18-118020 590 1070. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Чупахин О. Н., Сидорова Л. П., Перова Н. М. и др. 2-аминопропилморфолино-5-арил-6H-1,3,4-тиадиазины, дигидробромиды и 2-аминопропилморфолино-4-арилтиазолы, гидробромиды, обладающие антиагрегантным действием. Патент РФ № 2456284. 2012. [Chupakhin O. N., Sidorova L. P., Perova N. M. et al. 2-aminopropylmorpholine-5-aryl-6H-1,3,4-thiadiazine, dihydrobromide and 2-aminopropylmorpholine-4-arylthiazole, hydrobromide possessing antiplatelet effect. Patent RF № 2456284. 2012.]
2. Sarapultsev P. A., Chupakhin O. N., Medvedeva S. U., Mukhlynina E. A., Brilliant S. A., Sidorova L. P., Sarapultsev A. P. The impact of immunomodulator compound from the group of substituted thiadiazines on the course of stress reaction. International Immunopharmacology. 25(2). 2015. pp. 440–449.
3. Сидорова Л. П., Перова Н. М., Егорова Л. Г., Новикова А. П. Изучение реакционной способности

- 1,3,4-тиадиазинов в кислой и щелочной средах при трансформации в пиразолы // Тезисы I Все-союзной конференции по теоретической органической химии. Волгоград, 1991, 232. [Sidorova L. P., Perova N. M., Egorova L. G., Novikova A. P. Study of reactivity of 1,3,4-thiadiazines in acidic and alkaline media in the transformation into pyrazoles // Abstracts of the I all-Union conference on theoretical organic chemistry. Volgograd, 1991. P. 232].
4. Емельянов В. В., Саватеева Е. А., Сидорова Л. П., Цейтлер Т. А., Булавинцева Т. С., Гетте И. Ф., Данилова И. Г., Максимова Н. Е., Мочульская Н. Н., Чупахин О. Н., Черешнев В. А. Коррекция метаболических нарушений при аллоксановом сахарном диабете производными 1,3,4-тиадиазина. Российский иммунологический журнал. 2015. 9(18). 2(1). С. 487–489. [Emelyanov V. V., Savateeva E. A., Sidorova L. P., Tseitler T. A., Bulavintseva T. S., Gette I. F., Danilova I. G., Maksimova N. E., Mochulskaya N. N., Chupakhin O. N., Chereshev V. A. The correction of metabolic disorders in alloxan diabetes with 1,3,4-thiadiazine derivatives. Russian Immunological Journal. 2015. 9(18), 2(1). pp. 487–489].
  5. Данилова И. Г., Емельянов В. В., Гетте И. Ф., Медведева С. Ю., Булавинцева Т. С., Черешнева М. В., Сидорова Л. П., Черешнев В. А., Соколова К. В. Цитокиновая регуляция регенеративных процессов в поджелудочной железе у аллоксановых диабетических крыс и их коррекция 1,3,4-тиадиазинным составом и липолевоу кислотой. Медицинская иммунология. Т. 20 (1). 2018. С. 35–44. [Danilova I. G., Emelyanov V. V., Gette I. F., Medvedeva S. Yu., Bulavintseva T. S., Cheresheva M. V., Sidorova L. P., Chereshev V. A., Sokolova K. V. Cytokine regulation of regenerative processes in the pancreas in alloxan diabetic the wings and their correction 1,3,4-thiadiazine composition and lipoic acid. Medical immunology. V.20 (1). 2018. P. 35–44.]
  6. Емельянов В. В., Бриллиант С. А., Гетте И. Ф., Данилова И. Г., Ключева Ю. Н., Сидорова Л. П., Цейтлер Т. А. Влияние соединения 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин гидробромида на изменение гематологических показателей крыс с аллоксановым диабетом. Российский иммунологический журнал. 2018. Т. 12(21). № 3. С. 276–280. [Emelyanov V. V., Brilliant S. A., Gette, I. F., Danilova I. G., Klyueva Yu. N., Sidorova L. P., Zeitler T. A. Influence of the compound 2-morpholino-5-phenyl-6H-1,3,4-thiadiazin of the hydrobromide on the change of hematological parameters of rats with alloxan diabetes. Russian journal of immunology. 2018. V. 12(21). N.3. pp. 276–280.]
  7. Данилова И. Г., Гетте И. Ф., Булавинцева Т. С. Способ моделирования аллоксанового диабета. Патент РФ № 2534411.2014. [Danilova I. G., Gette I. F., Bulavintseva T. S. Method of modeling alloxan diabetes. Patent RF № 2534411. 2014].
  8. Казаков В. Я., Постовский И. Я. Синтезы и некоторые реакции 4-замещенных тиосемикарбазидов. Доклады Академии Наук СССР. 1960. Т. 134. № 4. С. 824–827. [Kazakov V. Ya., Postovskiy I. Ya. Syntheses and some reactions of 4-substituted thiosemicarbazides. Reports of the Science Academy of USSR, 1960. V. 134 (4). pp. 824–827].
  9. Емельянов В. В., Леонтьев Д. В., Ищенко А. В., Булавинцева Т. С., Саватеева Е. А., Данилова И. Г. Атомно-силовая микроскопия эритроцитов и метаболические нарушения при экспериментальном сахарном диабете и его коррекции липоевой кислотой. Биофизика. 2016. Т. 61. № 6. С. 922–926. [Emelyanov V. V., Leontiev D. V., Ishchenko A. V., Bulavintseva T. S., Savateeva E. A., Danilova I. G. Atomic force microscopy of erythrocytes and metabolic disorders in experimental diabetes mellitus and its correction with lipoic acid. Biophysics. 2016. V. 61(6). pp. 922–926].

## COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE EFFECT OF SUBSTITUTED 1,3,4-6H-THIADIAZINES ON THE PERIPHERAL BLOOD INDICED OF RATS WITH ALLOXAN DIABETES MELLITUS

© 2019 V. V. Emelianov<sup>2\*</sup>, I. G. Danilova<sup>1,2,3</sup>, S. A. Brilliant<sup>1,3</sup>,  
I. F. Gette<sup>1</sup>, L. P. Sidorova<sup>2</sup>, T. A. Tseitler<sup>2</sup>, Yu. N. Klyuyeva<sup>2</sup>

\*E-mail: v.v.emelianov@urfu.ru

<sup>1</sup>Institute of immunology and physiology UB RAS, Yekaterinburg, Russia;

<sup>2</sup>URAL Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia;

<sup>3</sup>GAUZ CO Institute of medical cell technologies, Ekaterinburg, Russia

Received: 18.05.2019. Accepted: 26.06.2019

The article presents data on the effect of substituted 1,3,4-thiadiazines (L-14, L-17) on the change in hematological parameters of rats with alloxan diabetes. The particular interest is the study of hematological parameters of rats in the development of alloxan diabetes mellitus and the possibility of its correction with compounds from a number of substituted 1,3,4-thiadiazines.

**Key words:** peripheral blood, alloxan diabetes, 2-aminopropylmorpholino-5-phenyl-6H-1,3,4-thiadiazine, dihydrobromide (L-14), 2-morpholino-5-phenyl-6H-1,3,4-thiadiazine hydrobromide (L-17)

**Authors:**

**Emelianov V. V.**, ✉ PhD, Associate Professor, Department of Immunochemistry, Associate Professor, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia; 620002 Ekaterinburg, URAL Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin. Phone: +7922 100 43 52, **E-mail:** v.v.emelianov@urfu.ru;

**Danilova I. G.**, Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Head of Laboratory of Morphology and Biochemistry IIF UB RAS; Head of the Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin; chief research officer, CELB GUZ SO IMKT, Ekaterinburg, Russia;

**Brilliant S. A.**, Junior Researcher, Immunophysiology and Immunopharmacology Laboratory, IIF UB RAS, junior scientific, CELB GUZ SO IMKT, Russian Federation, Ekaterinburg, Russia;

**Gette I. F.**, PhD, Senior Researcher, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Senior Researcher, Department of Immunochemistry, Institute of Chemical Technology, Ural Federal University named after the first president of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia;

**Sidorova L. P.**, Ph.D., Department of Life Safety, Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia;

**Tseitler T. A.**, Ph.D., Associate Professor of the Department of Organic and Biomolecular Chemistry, Ural Federal University named after the first president of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia;

**Klyuyeva Y. N.**, assistant of the Department of medical biochemistry and biophysics of the Federal State Optical Institute of the Ural Federal University named after the first President of Russia Boris N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia.

## ВЛИЯНИЕ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗКАХ СУБМАКСИМАЛЬНОЙ МОЩНОСТИ

© 2019 г. Е. Н. Ермолаева<sup>1\*</sup>, С. Л. Сашенков<sup>1</sup>, С. А. Кантюков<sup>1</sup>,  
В. И. Петухова<sup>1</sup>, В. П. Яковлева<sup>2</sup>

\*E-mail: ermen33@mail.ru

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Уральский государственный университет физической культуры», Челябинск, Россия

Поступила: 23.05.2019. Принята: 28.06.2019

Физическая нагрузка моделировалась в эксперименте на 42 белых беспородных крысах. Хроническая физическая нагрузка субмаксимальной мощности моделировалась ежедневным плаванием в течение 30 минут – 21 день: первые семь дней животные плавали без груза в течение 30 минут, следующие две недели с грузом 2% от массы тела. На 9, 15 и 21 день эксперимента животные подвергались дополнительно максимальной физической нагрузке: плавали в течение 4-х минут с грузом массой 20% от веса тела. Церулоплазмин вводился на 1, 4 и 7 сутки физической нагрузки, в суммарной дозе 60 мг/кг массы тела. Забор крови проводился на 9, 15 и 21 сутки эксперимента. В условиях эксперимента на крысах показано, что хроническая физическая нагрузка субмаксимальной мощности приводит к активации функциональной активности лейкоцитов и повышению выработки ИЛ-6 на 15, 21 сутки и ИЛ-4 на 21 сутки эксперимента. Введение церулоплазмина при физических нагрузках субмаксимальной мощности нивелирует повышенные уровни цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-4) и приводит их к контрольным показателям.

**Ключевые слова:** физическая нагрузка, церулоплазмин, интерлейкин-6, интерлейкин-4

DOI: 10.31857/S102872210007243-2

Адрес: 454092 Челябинск, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ермолаева Елена Николаевна.

E-mail: ermen33@mail.ru

Авторы:

**Ермолаева Е. Н.**, к. м. н., доцент кафедры нормальной физиологии имени академика Ю. М. Захарова ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

**Сашенков С. Л.**, д. м. н., профессор, зав. кафедрой нормальной физиологии имени академика Ю. М. Захарова ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

**Кантюков С. А.**, к. м. н., доцент кафедры биохимии имени Р. И. Лифшица ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

**Петухова В. И.**, к. м. н., ст. преподаватель кафедры нормальной физиологии имени академика Ю. М. Захарова ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

**Яковлева В. П.**, к. б. н., доцент кафедры теории и методики оздоровительных технологий и физической культуры Востока ФГБОУ ВО Урал ГУФК, Челябинск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Следствием чрезмерных физических нагрузок может быть повреждение, из-за нарушений ма-

кро- и микрогемодинамики, формирования гипоксии, наличия синдрома ишемия-реперфузия, миграции лейкоцитов в работающие мышцы, нарастания катаболических процессов и другие. Миогенный лейкоцитоз у спортсменов является временным, его величина напрямую связана с интенсивностью усилий (более выраженный в ответ на максимальную нагрузку), и наоборот [1]. Реакция лейкоцитов на физическую нагрузку является стереотипной: концентрация нейтрофилов увеличивается во время и после тренировки, а содержание лимфоцитов возрастает во время физических упражнений и может снизиться ниже нормальных значений после длительной физической работы. В ответ на лейкоцитарную реакцию и мышечную активность должна быть усилена продукция цитокинов, которые обладают мультифакторным действием: обеспечивают процессы межсистемного взаимодействия, отражают иммунный статус организма спортсмена и адаптацию к физическим нагрузкам. Проис-

ходит и активация острофазового ответа, в крови повышается концентрация белков острой фазы, в частности, церулоплазмينا. Церулоплазмин (ЦП) – медьсодержащий гликопротеин альфа-2-глобулиновой фракции сыворотки крови обладает мультифакторным действием на клетки крови при различных физиологических и патологических состояниях организма.

**Цель работы:** выявить влияние ЦП на продукцию про- и противовоспалительных цитокинов при ХФН субмаксимальной мощности

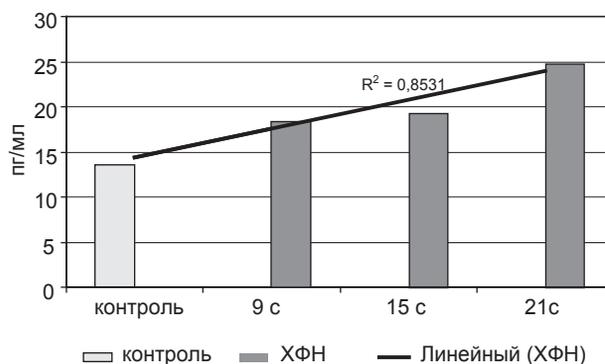
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на 42 половозрелых белых беспородных крысах массой 180–200 гр. Все исследования выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Параметры крови определяли после физической нагрузки различной интенсивности. ХФН умеренной мощности – ежедневное плавание в течение 30 минут без груза. ХФН субмаксимальной мощности – первые семь дней животные плавали без груза в течение 30 минут, следующие две недели с грузом 2% от массы тела. Забор крови производили на 9, 15, 21 сутки через 15–20 минут после дополнительной максимальной физической нагрузке: плавали в течение 4-х минут с грузом массой 20% от веса тела. нагрузке. Церулоплазмин (ЦП) вводился на 1, 4 и 7 сутки физической нагрузке, в суммарной дозе 60 мг/кг массы тела, что составляет 50% от его физиологического уровня в сыворотке крови. Контрольная группа – интактные крысы. Интерлейкины 6 и 4 определяли иммуноферментным методом с помощью наборов реагентов Rat IL-6, Rat IL-4 фирмы «Platinum ELISA» (Австрия). Результаты обрабатывались общепринятыми методами вариационной статистики: применяли критерий Манна-Уитни; определяли основную тенденцию изменений (тренд) и коэффициент аппроксимации.

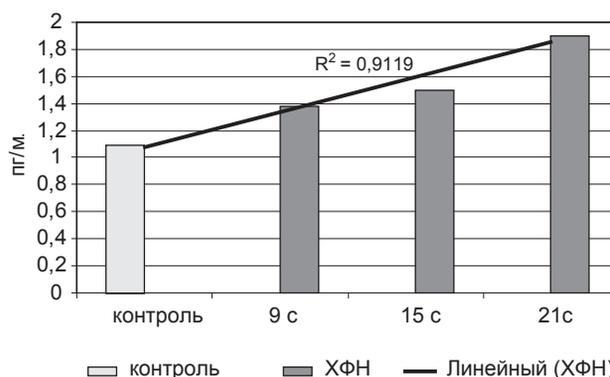
## РЕЗУЛЬТАТЫ

При ХФН субмаксимальной мощности регистрируется постепенное повышение ИЛ-6 на 15 сутки на 42%, на 21 сутки – 84%. Возрастание ИЛ-4 на 17,4% отмечается на 21 день эксперимента при ХФН субмаксимальной мощности (Таблица 1).

Физическая нагрузка вызывает повышение в крови провоспалительного цитокина ИЛ-6, возрастание которого приводит к удовлетворению



**Рисунок 1.** Влияние ЦП на изменение концентрации ИЛ-6 при ХФН субмаксимальной мощности



**Рисунок 2.** Влияние ЦП на изменение концентрации ИЛ-4 при ХФН субмаксимальной мощности

высоких энергетических требований. Закономерный рост уровня ИЛ 6 при хронической физической нагрузке субмаксимальной мощности подтверждается восходящей линией тренда с высоким коэффициентом аппроксимации  $R^2=0,85$  (Рисунок 1). Постепенное повышение ИЛ-6 при ХФН субмаксимальной мощности, можно рассматривать как механизм адаптации к нагрузке.

Несмотря на отсутствие достоверных отклонений уровня ИЛ-6 при ХФН субмаксимальной мощности на 9 и 15 сутки эксперимента линия тренда с высоким коэффициентом аппроксимации  $R^2=0,91$  подтверждает его закономерное повышение в динамике нагрузки (Рисунок 2). Повышение концентрации цитокина ИЛ-4 относительно контроля регистрируется лишь на 21 сутки эксперимента, что можно расценивать как фактор, способствующий устранению повреждений, вызванных интенсивной физической деятельностью.

Под действием ЦП уровень ИЛ-6 и ИЛ-4 не превышает контрольных значений во все сроки эксперимента, происходит нормализация повы-

**Таблица 1.** Влияние ЦП на изменение концентрации ИЛ-6, ИЛ-4 при хронической физической нагрузке субмаксимальной мощности

Группы сравнения	Контроль (n=6)	Опыт (животные, подвергшиеся хронической физической нагрузке)		
		9 сутки (n=6)	15 сутки (n=6)	21 сутки (n=6)
Интерлейкин-6, пг/мл				
ХФН	13,59±1,83	18,42±2,61	19,34±0,99*	24,89±2,59*
ХФН+ЦП		16,23±2,03	17,21±0,69	19,52±2,82
Интерлейкин-4, пг/мл				
ХФН	1,096±0,16	1,38±0,14	1,51±0,15	1,902±0,32*
ХФН+ЦП		1,23±0,12	1,18±0,16	1,28±0,12

**Примечание:** \* – достоверность различий по критерию Манна-Уитни с интактными животными

шенных значений цитокинов на 21 сутки ХФН субмаксимальной мощности (Таблица 1).

### ОБСУЖДЕНИЕ

В ряде исследований лейкоцитоз интерпретируется как указание на повреждение скелетных мышц при интенсивной физической нагрузке [2]. Нейтрофилы обуславливают иммунный ответ во время физических упражнений через синтез нейроэндокринных медиаторов, кортикотропин релизинг-факторов, интерлейкинов, свободных радикалов. Их производство резко возрастет во время физических упражнений [3, 4]. Макрофаги играют определенную роль в санации очага повреждения – переход от про- к противовоспалительному фенотипу в регенерирующей мышце; предотвращают апоптоз миоцитов; секретируют цитокины и факторы роста для активации миобластов, ангиогенеза [5]. Макрофаги последовательно управляют миогенезом во время репарации поврежденных скелетных мышц. В ответ, скелетная мышца постоянно адаптируется путем изменения в экспрессии генов и стабильности белка, влияющих на ее физиологические функции и массу. В раннем периоде провоспалительные макрофаги удаляют разрушенные клетки и синтезируют цитокины, которые играют ключевую роль в регуляции пролиферации, миграции и дифференциации клеток-сателлитов (миогенных клеток-предшественников). В дальнейшем вторжение противовоспалительных макрофагов способствует восстановлению тканей и уменьшению воспаления. Эта система обеспечивает эффективный механизм регенерации после острой травмы [2].

Дополнительным источником ИЛ-6 могут быть клетки скелетной мускулатуры, которые секретируют до 10–35% от его уровня в циркуляции. Секреция ИЛ-6 определяется интенсивностью нагрузки: при езде на велосипеде при 40% максимальном потреблении кислорода (умеренная нагрузка) уровень ИЛ-6 остается неизменным, а при нагрузке с 60% максимальным потреблением кислорода (интенсивная нагрузка) – повышается в 2,5 раза. Повышение ИЛ-6 следует рассматривать не только с точки зрения повреждения и формирования воспалительного ответа, но и участия в иных физиологических и метаболических процессах. В печеночных и жировых клетках ИЛ-6 приводит к повышенному выделению носителей энергии: глюкозы и жирных кислот, а в клетках скелетной мускулатуры – к их усвоению и утилизации. ИЛ-6 в мышечных клетках не только усиливает усвоение энергетического носителя, но и стимулирует оксидацию жирных кислот [6]. По-видимому, метаболическое действие цитокина реализуется путем его воздействия на регуляторные внутриклеточные комплексы, а также за счет разнонаправленного изменения чувствительности к инсулину. Доказательством действия ИЛ-6 на метаболизм являются исследования в опытах на мышцах, у которых индуцировали генетический дефект этого цитокина – Knockout (КО) модели. В условиях отсутствия ИЛ-6 в организме существенно повышался вес животных и особенно содержание жира [7]. У этих животных были зарегистрированы повышение базального уровня глюкозы и нарушение ее усвояемость, что можно оценить как развитие инсулинрезистентности. Такие мышцы с дефицитом ИЛ-6 не

способны к длительным физическим нагрузкам, во время тренировки у них нарушается усвоение кислорода [8]. Таким образом, можно сделать вывод, что ИЛ-6 необходим для обеспечения чувствительности организма к инсулину и обеспечения энергетических процессов в работающих органах (скелетной мускулатуре). ИЛ-6 способствует также долгосрочной адаптации к физическим нагрузкам, которая заключается в новообразовании митохондрий и изменении состава мышечных волокон. Было высказано предположение, что именно ИЛ-6 является гипотетическим «фактором тренировки» [9].

Интерлейкин-4, представляет собой плеiotропный цитокин, который играет важную роль в борьбе с воспалением. Основными производителями ИЛ-4 являются Т-клетки, тучные клетки и нейтрофилы. Было показано, что и другие клетки, такие как, мышечные клетки, гепатоциты, фибробласты способны продуцировать ИЛ-4. В ряде исследований было показано, что ИЛ-4, ИЛ-13, ИЛ-4RA и ИЛ-13Ra1 присутствуют в скелетных мышцах и увеличивают свою концентрацию после силовых тренировок [10]. Повреждения мышечных волокон становятся триггерами и запускают высвобождение противовоспалительных цитокинов [11]. ИЛ-4 приводит к устранению повреждений мышц, вызванных физической нагрузкой. Последние исследования показывают, что ИЛ-4 способствует росту мышечных клеток, и что этот цитокин действует как промигранционный агент для миогенных клеток. При отсутствии ИЛ-4 или рецепторов к ИЛ-4 происходит снижение мышечной массы и количества ядер в мышечных клетках [12]. Таким образом, увеличение содержания ИЛ-4 после утомительной тренировки может быть важным для роста и восстановления мышечных волокон.

Введение ЦП приводит к нормализации повышенных уровней цитокинов. Таким образом, ЦП, являясь основным антиоксидантом плазмы крови, оказал свое антирадикальное действие и снизил продукцию цитокинов нейтрофилами. Согласно, современным представлениям, ЦП является мультиферментом. ЦП может регулировать ПОЛ, как перехватчик супероксидного анион – радикала и гипохлорита [13]. ЦП обладает СОД активностью, но в отличие от СОД функционирует в крови [14]. Он восстанавливает  $O_2$  с помощью пары  $Si^{2+}$  до  $H_2O$ , перехватывает свободные кислородные радикалы и предохраняет липидосодержащие структуры

от повреждения [15]. ЦП оказывает выраженное антиоксидантное действие, нормализуя функциональное состояние лейкоцитов и их способность продуцировать интерлейкины 4 и 6.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, при хронической физической нагрузке субмаксимальной мощности на 21 сутки в крови повышается уровень провоспалительного цитокина ИЛ-6 и противовоспалительного цитокина ИЛ-4. Возрастание ИЛ-6 приводит к удовлетворению высоких энергетических требований организма при физических нагрузках. Повышение цитокина ИЛ-4 можно расценивать как фактор, способствующий устранению повреждений, вызванных интенсивной физической деятельностью. Под действием ЦП, как антиоксиданта, нормализуется функциональное состояние лейкоцитов и их способность продуцировать цитокины: уровень ИЛ-6 и ИЛ-4 не превышает контрольных значений во все сроки эксперимента, происходит нормализация повышенных значений цитокинов при ХФН субмаксимальной мощности на 21 сутки эксперимента.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Tossige-Gomes R., Ottone V. O., Oliveira P. N. et al.* Leukocytosis, muscle damage and increased lymphocyte proliferative response after an adventure sprint race. *Braz J Med Biol Res*, 2014, 47(6), 492–498.
2. *Tidball J. G.* Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Compr Physiol*, 2011, 1(4), 2029–2062.
3. *Ермолаева Е. Н., Кривохижина Л. В., Мезенцева Е. А.* Изменение лейкоцитарных индексов при хронической физической нагрузке. *Российский иммунологический журнал*, 2015, 9(18), 2(1), 60–62. [*Ermolaeva E. N., Krivokhizhina L. V., Mezentseva E. A.* Influence of physical activity of different intensity on the level of interleukins 6, 4. *Russian Immunological Journal*, 2015, 9(18), 2(1), 60–62.]
4. *Kakanis M. W., Peake J., Brenu E. W. et al.* The open window of susceptibility to infection after acute exercise in healthy young male elite athletes. *Exerc Immunol Rev*, 2010, 16, 119–137.
5. *Dias R., Frollini A. B., Brunelli D. T. et al.* Immune parameters, symptoms of upper respiratory tract infections, and training-load indicators in volleyball athletes. *Int J Gen Med*, 2011, 4, 837–844.
6. *Hojman P., Brolin C., Nørgaard-Christensen N. et al.* IL-6 released from muscles during exercise is stimulated by lactate-dependent protease activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2019, 316(5), 940–947.
7. *Xu Y., Zhang Y., Ye J.* IL-6: a potential role in cardiac metabolic homeostasis. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9), 2474.
8. *Gudixsen A., Schwartz C. L., Bertholdt L. et al.* Lack of skeletal muscle IL-6 affects pyruvate dehydrogenase

- activity at rest and during prolonged exercise. PLoS One, 2016, 11(6), 0156460.
9. *Serrano A. L., Baeza-Raja B., Perdiguerro E. et al.* Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metabolism*, 2008, 7(1), 33–44.
  10. *Prokopchuk O., Liu Y., Wang L. et al.* Skeletal muscle IL-4, IL-4Ralpha, IL-13 and IL-13Ralpha1 expression and response to strength training. *Exerc Immunol Rev*, 2007, 13, 67–75.
  11. *Rosa Neto J. C., Lira F. S., Oyama L. M. et al.* Exhaustive exercise causes an anti-inflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in dipose tissue in rats. *Eur J Appl Physiol*, 2009, 106(5), 697–704.
  12. *Hoier B., Nordsborg N., Andersen S. et al.* Pro- and anti-angiogenic factors in human skeletal muscle in response to acute exercise and training. *J Physiol*, 2012, 590(3), 595–606.
  13. *Мжельская Т. И.* Биологические функции церулоплазмينا и их дефицит при мутациях генов, регулирующих обмен меди и железа (обзор). Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2000, 130(8), 124–133. [*Mzhelskaya T. I.* Biological functions of ceruloplasmin and their deficiency mutations in genes regulating copper metabolism and iron (review). *Bulletin of experimental biology and medicine*, 2000, 130(8), 124–133.]
  14. *Halliwel B., Gutteridge J. M. C.* Ceruloplasmin and the superoxide radical. *Lancet*, 1982, 2, 556–559.
  15. *Sergeev A. G., Pavlov A. R., Revina A. A. et al.* The mechanism of interaction of ceruloplasmin with superoxide radicals. *Int J Biochem*, 1993, 25(11), 1549–1554.

## INFLUENCE OF CERULOPLASMIN ON CYTOKINE PRODUCTION DURING CHRONIC PHYSICAL LOADS OF SUBMAXIMAL POWER

© 2019 E. N. Ermolaeva<sup>1\*</sup>, S. L. Sashenkov<sup>1</sup>, S. A. Kantuykov<sup>1</sup>,  
V. I. Petuhova<sup>1</sup>, V. P. Jakovleva<sup>2</sup>

\*E-mail: ermen33@mail.ru

<sup>1</sup>FSBEI of Higher Education “South Ural State Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

<sup>2</sup>FSBEI of Higher Education “Ural State University of Physical Culture”, Chelyabinsk, Russia

Received: 23.05.2019. Accepted: 28.06.2019

Exercise was modeled in an experiment on 42 white mongrel rats. Chronic physical exercise submaximal power was modeled by daily swimming for 30 minutes—21 days: the first seven days the animals swam without load for 30 minutes, the next two weeks with a load of 2% of body weight. On the 9<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day of the experiment, the animals were additionally subjected to maximum exercise: they swam for 4 minutes with a weight of 20% of their body weight. Ceruloplasmin was administered on the 1<sup>st</sup>, 4<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day of physical activity, in a total dose of 60 mg/kg body weight. Blood sampling was carried out on the 9<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day of the experiment. Under the experimental conditions in rats, it was shown that chronic physical exertion of submaximal power leads to the activation of the functional activity of leukocytes and an increase in the production of IL-6 by 15, 21 days and IL-4 by 21 days of the experiment. The introduction of ceruloplasmin during physical exertion of submaximal power levels out elevated levels of cytokines (IL-6, IL-4) and leads them to control indicators.

*Key words:* exercise, ceruloplasmin, interleukin-6, interleukin-4

### Authors:

**Ermolaeva E. N.**, ☒ PhD, associate professor, Department of Normal Physiology named after academician Yu. M. Zakharova, South Ural State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Chelyabinsk, Russia;

454092 Chelyabinsk, South Ural State Medical University, Ministry of health of Russia. Phone: +79823143962.

**E-mail:** ermen33@mail.ru

**Sashenkov S. L.**, MD, professor, head of the Department of Normal Physiology named after academician Yu. M. Zakharova South Ural State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Chelyabinsk, Russia;

**Kantuykov S. A.**, PhD, associate professor, Department of biological chemistry named after R. Lifshits, South Ural State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Chelyabinsk, Russia;

**Petuhova V. I.**, PhD, senior lecturer, Department of Normal Physiology named after academician Yu. M. Zakharova, South Ural State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Chelyabinsk, Russia;

**Jakovleva V. P.**, PhD, associate professor, Department of Theory and Methods of Healthy Technologies and Physical Culture of the East, Ural State University of Physical Culture, Chelyabinsk, Russia.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ РАЗРАБОТКИ И КОНСТРУИРОВАНИЯ НОВОГО БИОГЕПАТОПРОТЕКТОРА

© 2019 г. Н. А. Забокрицкий

E-mail: pharmusma@rambler.ru

ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии образования, Екатеринбург, Россия

Поступила: 23.05.2019. Принята: 28.06.2019

В работе приведены результаты доклинических исследований по выбору микроорганизмов для конструирования комплексного пробиотического препарата с выраженным гепатопротекторным действием. Экспериментально установлено, что наибольшую антагонистическую активность в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов проявили пробиотические штаммы *Bacillus subtilis* B-2335, B-4759, B-9906. Получены экспериментальные данные, что штаммы *Bacillus subtilis* B-9906, *Bacillus subtilis* B-4759 обладали способностью продуцировать протеолитические и амилалитические ферменты не только сравнительно в более высоких концентрациях, но и на более ранние сроки культивирования;. Установлено, что наиболее перспективными штаммами для конструирования комбинированного биогепаатопротектора являются три штамма: *Bacillus subtilis* B-2335, B-4759, B-9906.

**Ключевые слова:** пробиотик, штаммы *Bacillus subtilis*, конструирование

DOI: 10.31857/S102872210007244-3

**Адрес:** Екатеринбург, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Забокрицкий Николай Александрович.

Тел.: +73433740070, E-mail: pharmusma@rambler.ru

**Автор:**

**Забокрицкий Н. А.**, д.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии образования, Екатеринбург, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям, гепатопротекторные препараты для лечения токсических поражений печени должны обладать следующими свойствами:

- хорошей всасываемостью в желудочно-кишечном тракте;
- эффектом “первого прохождения” через печень;
- способностью к естественному метаболизму при имеющейся патологии печени;
- энтерогепатической циркуляцией и способностью предупреждать образование высокоактивных повреждающих соединений или способностью связывать такие соединения;

- противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами;
- способностью подавлять фиброгенез; а также стимулировать регенеративные и репаративные процессы в печени;
- отсутствием токсичности.

К сожалению, на сегодняшний день ни один из используемых в медицинской практике гепатопротекторов не удовлетворяет в полной мере этим требованиям, хотя в последние годы арсенал современных гепатозащитных средств расширился за счёт появления как синтетических препаратов, так и новых природных (в основном растительного происхождения) средств.

В настоящее время при лечении токсических поражений печени важная роль отводится патогенетической терапии, которая направлена на коррекцию факторов, играющих существенную роль в механизмах повреждения паренхимы печени.

В комплексном лечении токсических поражений печени применяют и такую фармакологическую группу препаратов, которые обладают избирательным защитным действием в отношении печени — это так называемые гепатопротекторы.

текторы. Их системное действие направлено на восстановление гомеостаза в органе, повышение устойчивости гепатоцитов к воздействию патогенных факторов, нормализацию функциональной активности и стимуляцию репаративно-регенерационных процессов в печени.

Следует отметить, что проблема создания эффективного гепатопротекторного препарата, отвечающего вышеприведенным требованиям, остается до настоящего времени недостаточно разработанной и, в связи с этим, актуальной для решения задач здравоохранения по сохранению полноценного здоровья народонаселения России [1, 2].

Выполненные нами исследования, а также многолетний опыт проведения экспериментальных исследований по изучению микроорганизмов, обладающих пробиотическими свойствами, и практического использования лекарственных средств и препаратов, созданных на их основе, позволили нам полагать с высокой степенью вероятности о наличии возможности разработки нового пробиотического гепатопротекторного средства [2, 3].

**Цель исследования** — выбор микроорганизмов для конструирования комплексного пробиотического препарата с выраженным гепатопротекторным действием.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в ФГБУН Институте иммунологии и физиологии УрО РАН.

Для решения поставленной задачи необходимо было, в первую очередь, провести исследования по выбору конкретного вида и штамма пробиотического микроорганизма, в экспериментальных исследованиях изучить его биологические свойства и по совокупности полученных результатов принять решение о целесообразности создания на его основе экспериментального образца нового гепатопротекторного средства.

В настоящее время накоплен значительный научный материал, свидетельствующий о том, что наибольшим биологическим потенциалом и набором конкретных позитивных свойств, которые эффективно можно использовать для разработки пробиотических препаратов являются непатогенные спорообразующие микроорганизмы рода *Bacillus* и, в частности, различные штаммы сенной палочки. Установлено, что они характеризуются выраженными антагонистическими свойствами в отношении многих видов условно-патогенных и патогенных микроорганизмов,

способностью оказывать иммуномодулирующее действие (в основном за счет стимулирования различных звеньев клеточного и гуморального иммунитета), а также обладают антитоксическими, антиаллергическими, противорадиационными и другими эффектами [4, 5].

Выбор бактериальных микроорганизмов, перспективных для использования их в качестве основы для создания новых пробиотических препаратов, осуществляли по следующим критериям: результатам всестороннего изучения их родовых и видовых характеристик, а также биологических особенностей выбранных штаммов; отсутствию патогенных свойств, безопасности для человека (в комплексных доклинических исследованиях); степени антагонистической активности в отношении различных видов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов; уровню биохимических свойств; отсутствию гемолитической активности, выраженности лечебных и протективных свойств пробиотиков, сконструированных с их использованием [6, 7].

Согласно требованиям, приведенным в Санитарных правилах СП 1.2.731–99, штаммы *Bacillus subtilis* относятся к сапрофитам, то есть микроорганизмам, непатогенным для человека и животных, работа с ними не требует специальных мер биологической защиты.

Определение антагонистической активности проводили в отношении тест-культур, полученных из музея ФГБУ ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Для проведения исследований использовали штаммы тест-культур: *Staphylococcus aureus* 209P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Candida albicans* ИМВ 690, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9024, *Salmonella typhimurium* 55, *Escherichia coli* 0157, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Proteus vulgaris* 177.

Родовую индикацию и видовую идентификацию проводили используя традиционные микробиологические методы исследований, а также идентификационные наборы МИКРО-ЛА-ТЕСТ и книги кодов СМММ-2 и Микроб-Автомат.

Конструирование, приготовление, изучение свойств, условий хранения и создаваемых на их основе экспериментальных образцов пробиотических препаратов осуществляли в соответствии с действующими требованиями и рекомендациями, изложенными в источниках литературы, посвященных вопросам биотехнологии [8, 9].

Отбор проб для бактериологических исследований проводили установленным порядком. Идентификацию выделенных микроорганизмов

осуществляли после получения чистых культур по морфологическим, культуральным, биохимическим и антигенным признакам с использованием идентификационных наборов.

Статистическую обработку осуществляли с помощью пакетов компьютерных программ Microsoft Office Excel 2007 и “Statistica 6.0”. Результаты представлены в виде средней арифметической (M) и средней ошибки среднего арифметического (m). Использовали метод дисперсионного анализа (ANOVA). Оценку нормальности распределения полученных данных проводили по методу Колмогорова-Смирнова. Для оценки достоверности межгрупповых различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни и параметрический F-критерий Фишера в зависимости от нормальности распределения данных. Проверку статистических гипотез осуществляли при критическом уровне значимости  $p < 0,05$ . В ряде случаев для сравнения зависимых выборок использовали непараметрический W-критерий Вилкоксона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На данном этапе нами были проведены экспериментальные исследования по углубленному изучению биологических свойств вышеперечисленных штаммов с целью обоснования объективных критериев для выбора конкретного штамма, обладающего наиболее приемлемыми свойствами для конструирования на его основе экспериментального образца гепатопротекторного средства.

Одним из важных критериев безопасного применения пробиотических штаммов для создания фармакологических препаратов является отсутствие у них гемолитической активности.

Анализ полученных сравнительных экспериментальных данных свидетельствует о том, что все выбранные для исследований бактериальные штаммы обладают достаточно высоким уровнем специфической антагонистической активности и способны подавлять рост и размножение тест-штаммов различных групп патогенности, **Таблица 1.**

**Таблица 1.** Оценка антагонистической активности спорных культур штаммов *Bacillus subtilis* ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )

№ п/п	Образцы препаратов	Зоны угнетения роста тест-культур, мм						
		<i>Candida albicans</i> 690	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 14990	<i>Escherichia coli</i> 0157	<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027	<i>Proteus vulgaris</i> 15	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC19615
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.	<i>Bacillus subtilis</i> B-2335	23,6±2,0*	24,5±2,3*	26,9±3,1*	20,8±1,8*	22,3±1,9*	14,4±1,1*	21,2±1,9*
2.	<i>Bacillus subtilis</i> B-4759	20,2±1,8*	21,6±1,9*	23,2±2,1*	19,8±1,7*	17,1±1,5*	16,6±1,5*	17,9±1,6*
3.	<i>Bacillus subtilis</i> B-2895	20,3±1,9*	21,8±1,9*	22,5±2,0*	19,3±1,6*	18,4±1,8*	14,6±1,2*	17,3±1,7*
4.	<i>Bacillus subtilis</i> B-3679	24,7±2,8*	20,5±1,8*	23,6±2,2*	24,0±2,6*	17,7±1,6*	12,9±1,1*	21,5±2,0*
5.	<i>Bacillus subtilis</i> B-9906	28,1±3,7*	26,0±3,2*	более 35	23,3±2,2*	21,6±1,8*	19,4±1,6*	23,1±2,2*
6.	<i>Bacillus subtilis</i> B-9909	20,6±2,0*	19,2±1,6*	22,8±2,1*	22,2±2,1*	15,6±1,3*	13,4±1,1*	20,6±1,9*
7.	Контроль (стерильное вазелиновое масло)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

**Примечание:** \* – достоверные ( $p < 0,05$ ) различия по U-критерию Манна-Уитни по отношению к группе «Контроль (стерильное вазелиновое масло)».

**Таблица 2.** Гемолитическая активность исследуемых штаммов *Bacillus subtilis* ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )

Исследуемая культура	Срок наблюдения, сут.	Зона гемолиза на питательных средах, мм				
		Плотная питательная среда Гаузе 2 с добавлением дефибринированной кроличьей крови, %				
		10% кровяной агар	10% кровяной агар	20% кровяной агар + 1% глюкоза	10% кровяной агар	20% кровяной агар + 1% глюкоза
№ серии		18	19	19	20	17
<i>Bacillus subtilis</i> B-2335	2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
<i>Bacillus subtilis</i> B-4759	2	1,2±0,1	1,4±0,2	1,1±0,1	2,3±0,3	1,0±0,1
	3	1,3±0,1	1,0±0,1	1,2±0,1	2,0±0,2	0,0±0,0
<i>Bacillus subtilis</i> B-2895	2	1,0±0,1	1,1±0,1	1,0±0,1	3,5±0,8	2,3±0,4
	3	1,3±0,1	1,2±0,1	1,1±0,1	5,2±1,4	1,2±0,1
<i>Bacillus subtilis</i> B-3679	2	2,8±0,6	2,1±0,1	0,0±0,0	2,0±0,2	2,1±0,2
	3	2,3±0,4	2,0±0,3	0,0±0,0	2,5±0,5	2,7±0,5
<i>Bacillus subtilis</i> B-9906	2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
<i>Bacillus subtilis</i> B-9909	2	1,0±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,1±0,1
	3	1,3±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,2±0,1

**Примечание:** достоверных ( $p < 0,05$ ) различий по U-критерию Манна-Уитни по отношению к соответствующим группам высеванных на «плотной питательной среде Гаузе 2 с добавлением дефибринированной кроличьей крови» не установлено.

В наших исследованиях (Таблица 2), установлено полное отсутствие гемолитических свойств у штаммов *Bacillus subtilis* B-2335, *Bacillus subtilis* B-9906, незначительный уровень гемолитической активности обнаружен у штаммов *Bacillus subtilis* B-4759, *Bacillus subtilis* B-9909, *Bacillus subtilis* B-3679 и *Bacillus subtilis* B-2895.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Отмечено, что наибольшая антагонистическая активность определяется у штаммов *Bacillus subtilis* B-4759, *Bacillus subtilis* B-9906, *Bacillus subtilis* B-9909, в тоже время размеры зоны подавления у штамма *Bacillus subtilis* B-9906 были практически во всех случаях выше, чем у других сравниваемых штаммов. Таким образом, оценка биохимической активности изучаемых штаммов, показала, что протеолитические и амилолитические ферменты при глубинном способе культивирования в наибольших концентрациях синтезируются в жидких питательных средах такими штаммами, как *Bacillus subtilis* B-9906, *Bacillus subtilis* B-4759, *Bacillus subtilis* B-2335.

Причем штаммы *Bacillus subtilis* B-9906, *Bacillus subtilis* B-4759 обладали способностью продуцировать указанные ферменты не только сравнительно в более высоких концентрациях, но и на более ранние сроки культивирования.

### ВЫВОДЫ

1. Наибольшую антагонистическую активность в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов проявили пробиотические штаммы *Bacillus subtilis* B-2335, B-4759, B-9906.

2. Установлено, что штаммы *Bacillus subtilis* B-9906, *Bacillus subtilis* B-4759 обладали способностью продуцировать протеолитические и амилолитические ферменты не только сравнительно в более высоких концентрациях, но и на более ранние сроки культивирования;

3. Установлено полное отсутствие гемолитических свойств у штаммов *Bacillus subtilis* B-2335, *Bacillus subtilis* B-9906;

4. Наиболее перспективными штаммами для конструирования комбинированного биогепа-

топротектора являются три штамма: *Bacillus subtilis* B-2335, B-4759, B-9906.

Работа выполнена по теме из Плана НИР ИИФ УрО РАН, № гос. регистрации АААА-А18-118020690020-1.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Забокрицкий Н. А.* Экспериментальная оценка коррекции гуморального иммунитета гепатопротекторным препаратом гепатобиол у лабораторных животных с острым токсическим гепатитом. Российский иммунологический журнал, 2017, 11, 2(20), 123–126. [*Zabokritskiy N. A.* Experimental estimation of correction of humoral immunity hepatoprotective drug hepatobiol in laboratory animals C acute toxic hepatitis, 2017, 11, 2(20), 123–126].
2. *Забокрицкий Н. А.* Разработка экспериментального образца нового гепатопротектора. Российский иммунологический журнал, 2018, 3, 12(21), 301–305. [*Zabokritskiy N. A.* Development of experimental sample of a new hepatoprotector, 2018, 3, 12(21), 301–305].
3. *Забокрицкий Н. А.* Оценка иммунотропного действия пробиотика бацилакт в составе трансдермальных терапевтических систем. Российский иммунологический журнал, 2017, 11, 2(20), 126–129. [*Zabokritskiy N. A.* Preclinical evaluation of immunotropic action of probiotics bacilack transdermal therapeutic system, 2017, 11, 2(20), 126–129].
4. *Holzapfel W. H., Schillinger U.* Introduction to pre- and probiotics. Food Research International 35, 2002, 109–116.
5. *Kailasapathy K. A., Chin J.* Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Immunol. Cell. Biol., 2000, 78, 80–88.
6. *Lee Y. K., Salminen S.* Handbook of Probiotics and Prebiotics. John Wiley and Sons, Ltd., 2009, 132–144.
7. *Russel J., Cohn R.* Probiotics. U.K., Edinburgh: LEN-NEX Corp. 2012, 5–58.
8. *Забокрицкий Н. А.* Обоснование направлений в разработке и экспериментальном изучении новых фармакологических препаратов на основе пробиотиков и их биологически активных продуктов: автореф. дис. ... д-ра. мед. наук., 2014. 3–16. [*Zabokritskiy N. A.* Study areas in the development and experimental study of new pharmacological products based on probiotics and their bioactive products: abstract of dis. ... dr. med. sciences, 2014. 3–16].
9. *Лабинская А. С.* Микробиология с техникой микробиологических исследований. Бином, М., 2012. 72–124. [*Labinskaya A. S.* Microbiology with technique of microbiological studies.: Binom, Moscow, 2012. 72–124].

## IMMUNOBIOLOGICAL ASPECTS OF THE APPLICATION OF THE NEW METABIOTICS

© 2019 N. A. Zabokritskiy

E-mail: pharmusma@rambler.ru

Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg, Russia

Received: 23.05.2019. Accepted: 28.06.2019

The paper presents the results of preclinical studies on the choice of microorganisms for the design of a complex probiotic drug with a pronounced hepatoprotective effect. It has been experimentally established that probiotic strains *Bacillus subtilis* B-2335, B-4759, B-9906 showed the greatest antagonistic activity against pathogenic and opportunistic microorganisms. Experimental data have been obtained that strains *Bacillus subtilis* B-9906, *Bacillus subtilis* B-4759 had the ability to produce proteolytic and amylolytic enzymes not only relatively in higher concentrations, but also for earlier periods of cultivation;. It was found that the most promising strains for the design of a combined biohepatoprotector are three strains: *Bacillus subtilis* B-2335, B-4759, B-9906.

*Key words:* probiotic, *Bacillus subtilis* strains, design

### Author:

**Zabokritskiy N. A.**, MD, PhD, assistant professor of the laboratory of immunophysiology and immunopharmacology of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia.

Yekaterinburg, Institute of immunology and physiology, Ural branch of the Russian Academy of Sciences. Phone: +73433740070,

E-mail: pharmusma@rambler.ru

## ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ НОВОГО МЕТАБИОТИКА

© 2019 г. Н. А. Забокрицкий

E-mail: pharmusma@rambler.ru

ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии образования, Екатеринбург, Россия

Поступила: 23.05.2019. Принята: 28.06.2019

В работе приведены результаты клинико-лабораторного исследования нового метабиотического препарата Дентозар на основе биологически активных веществ пробиотического штамма *Bacillus subtilis B-3679*. Дана оценка состояния и динамики изменения таких интегральных иммунологических показателей, характеризующих состояние здоровья пациентов, как уровень активности лизоцима и концентрацию sIgA, а также IgA, M, G в слюнной жидкости больных хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести. Установлено, что метабиотик оказался безопасным для применения и обладал выраженным положительным клинико-терапевтическим эффектом, нормализует микробиоценоз ротовой полости, что сопровождается снижением количества условно-патогенной микрофлоры и повышением концентрации представителей нормальной микрофлоры. Экспериментально установлено, что изучаемый метабиотик обладает высокой антагонистической активностью в отношении различных видов условно-патогенных микроорганизмов, выделяемых у больных пародонтитом и способствует повышению активности лизоцима слюнной жидкости и иммуноглобулинов A и G.

**Ключевые слова:** метабиотик, *Bacillus subtilis B-3679*, иммунологические показатели

DOI: 10.31857/S102872210007245-4

**Адрес:** Екатеринбург, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Забокрицкий Николай Александрович.

Тел.: +73433740070, E-mail: pharmusma@rambler.ru

**Автор:**

**Забокрицкий Н. А.**, д.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии образования, Екатеринбург, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время по результатам многочисленных теоретических и экспериментальных исследований определена роль и основные функции нормальной микрофлоры человека [1–3].

Так установлено, что нормальная микрофлора участвует в обмене веществ, экзогенных субстратов и метаболитов, белков, жиров, углеводов, холестерина, стероидных гормонов, желчных солей и т.п., регулирует сорбцию и выделение ионов Na, Cl, K, Ca, Mg, Zn, Fe, Cu, P, Mn и др., обладает антагонистической активностью к патогенной и условно-патогенной ми-

крофлоре [2, 3, 4], является одним из факторов неспецифической устойчивости, продуцирует биологически активные соединения, в том числе антибиотики и витамины группы B, K и др. Она также обеспечивает колонизационную резистентность микроорганизмов, участвуют в процессах физиологического воспаления и способна оказывать детоксицирующее и антимуtagenное воздействие, путем разрушения канцерогенных веществ. Считается также, что нормальная микрофлора – это “хранилище и источник различных хромосомных и плазмидных генов” [3–5].

Считается, что единственным эффективным способом восстановления состава микрофлоры и нормализации ее функционирования является использование пробиотических препаратов в рамках современной концепции микробиологической терапии.

В настоящее время к числу высокоэффективных лечебно-профилактических медикаментозных средств отечественные и зарубежные специалисты относят пробиотические фармакологические препараты [3, 5, 6].

Пробиотики – медицинские иммунобиологические препараты на основе живых бактерий, антагонистически активных в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и не оказывающих отрицательного влияния на представителей нормальной микрофлоры [5, 6].

Особую значимость дисбиотические процессы приобретают при возникновении заболеваний органов и тканей полости рта, в частности, пародонтитах различной степени тяжести (от легкой до тяжелой степени) и распространенности (локализованные, генерализованные).

При пародонтитах происходит существенное изменение микробного пейзажа, перестройка аэробной аутохтонной микрофлоры, увеличение количества условно-патогенных и анаэробных видов. Приводим перечень и частоту выделения различных микроорганизмов у больных пародонтитом и здоровых лиц. Так, лактобациллы выделяли (%) соответственно в 81,7 и 91,6 случаев, *Streptococcus salivarius* 43,3 и 100,0, *Streptococcus sanguis* 34,1 и 85,9, *Streptococcus mitis* 35,8 и 19,6, *Streptococcus mutans* 35,8 и 12,1, *Streptococcus pyogenes* 13,3 и 0,0, *Staphylococcus aureus* 55,0 и 26,2, *Staphylococcus epidermidis* 43,3 и 63,5, *Candida spp.* 50,0 и 21,3, *Escherichia coli* 17,5 и 0,0, *Klebsiella spp.* 12,5 и 0,0, *Proteus spp.* 4,2 и 0,0, *Enterobacter spp.* 6,6 и 0,0, *Pseudomonas aeruginosae* 2,5 и 0,0, *Neisseriae* 13,3 и 7,9, *Fusobacterium spp.* 50,0 и 2,9, *Veillonella spp.* 59,2 и 14,9, *Bacteroides spp.* 50,0 и 24,3, *Artinomyces spp.* 60,0 и 1,8, *Porphyromonas spp.* 25,8 и 0,0, *Prevotella spp.* 57,5 и 2,8, *Peptostreptococcus spp.* 12,0 и 0,0 [7, 8].

Приведенные экспериментальные данные являются объективным доказательством наличия дисбиоза ротовой полости у больных пародонтитом, сопровождающегося существенным возрастанием общего количества различных видов условно-патогенных микроорганизмов на фоне значительного уменьшения представителей нормальной микрофлоры.

**Целью** настоящего исследования явилось клинико-лабораторное исследование нового метабиотического препарата Дентозар на основе биологически активных веществ пробиотического штамма *Bacillus subtilis B-3679* для оценки состояния и динамики изменения таких интегральных иммунологических показателей, характеризующих состояние здоровья пациентов, как уровень активности лизоцима и концентрацию sIgA, а также IgA, M, G в слюнной жидкости больных хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в ФГБУН Институте иммунологии и физиологии УрО РАН.

Выбор бактериальных микроорганизмов, перспективных для использования их в качестве основы для создания новых пробиотических препаратов, осуществляли по следующим критериям: результатам всестороннего изучения их родовых и видовых характеристик, а также биологических особенностей выбранных штаммов; отсутствию патогенных свойств, безопасности для человека (в комплексных доклинических исследованиях); степени антагонистической активности в отношении различных видов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов; уровню биохимических свойств; отсутствию гемолитической активности, выраженности лечебных и протективных свойств пробиотиков, сконструированных с их использованием [3, 4].

Использовали бактериальные споровые культуры следующего пробиотического штамма *Bacillus subtilis B-3679*. Данный штамм депонирован и находится на постоянном хранении во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (ФГУП ГосНИИГенетика).

Определение антагонистической активности проводили в отношении тест-культур, полученных из музея ФГБУ ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Для проведения исследований использовали штаммы тест-культур: *Staphylococcus aureus 209P*, *Staphylococcus epidermidis ATCC 14990*, *Candida albicans ИМВ 690*, *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9024*, *Salmonella typhimurium 55*, *Escherichia coli 0157*, *Streptococcus pyogenes ATCC 19615*, *Proteus vulgaris 177*.

Родовую индикацию и видовую идентификацию проводили используя традиционные микробиологические методы исследований, а также идентификационные наборы МИКРО-ЛА-ТЕСТ и книги кодов СМММ-2 и Микроб-Автомат.

Конструирование, приготовление, изучение свойств, условий хранения и создаваемых на их основе экспериментальных образцов пробиотических препаратов осуществляли в соответствии с действующими требованиями и рекомендациями, изложенными в источниках литературы, посвященных вопросам биотехнологии [4, 5].

В состав экспериментального образца препарата комплекса БАВ были включены метаболиты пробиотических бактериальных клеток *Bacillus subtilis ВКПМ B-3679*, прополис, никотиновая кислота, кальция пантотенат, пиридоксин, ментол, эфирные масла мяты перечной, шалфея, лаванды, а также глицерин.

Комплекс биологически активных веществ получали в лабораторных условиях по имеющимся в настоящее время в научной литературе рекомендациям [3, 4, 6, 7].

Метаболиты выделяли из КЖ, находящихся в конце экспоненциальной фазы роста бактериальных клеток *Bacillus subtilis* штаммов В-3679 при их глубинном культивировании.

Качественное и количественное содержание метаболитов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разделение проводили при комнатной температуре с использованием колонки Supelcosil™ LC-18 (250 x 4,6 мм, размер частиц ¼ 5 мкм).

Химический состав выделяемых БАВ в составе Дентозара в среднем характеризовался следующими показателями: белково-полисахаридный комплекс – 250–300 мг.г<sup>-1</sup>; (общее количество белка) свободные аминокислоты – 120–140 мг.г<sup>-1</sup>; гексозамин – 40–50 мг.г<sup>-1</sup>; пуриновые и пиримидиновые основания: аденин – 16–17 мг.г<sup>-1</sup>, гуанин – 2–3 мг.г<sup>-1</sup>, цитозин – 2–4 мг.г<sup>-1</sup>, тиамин – 3–5 мг.г<sup>-1</sup>, урацил – 12–14 мг.г<sup>-1</sup>; водорастворимые витамины: пиридоксин (В<sub>6</sub>) – 1,5 мкг.г<sup>-1</sup>, рибофлавин (В<sub>2</sub>) – 1,7 мкг.г<sup>-1</sup>; ферментативный комплекс: активность протеолитических ферментов – 900–950 ед.г<sup>-1</sup>, активность амилолитических ферментов – 1000–1100 ед.г<sup>-1</sup>; антибиотики и антибиотикоподобные соединения – 0,1–0,5%; другие соединения – менее 5%.

Незначительные колебания химического состава зависели в основном от условий культивирования (качества питательных сред) и технологических особенностей выделения БАВ [8].

Для оценки активности клеточных факторов неспецифического иммунитета у экспериментальных животных получали клетки перитонеального экссудата. Метаболическую активность фагоцитов определяли в НСТ-тесте. Исследование фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови, перитонеальных макрофагов осуществляли путем спектрофотометрии клеточной суспензии (КМС) с добавлением соответствующих красителей. Определение количества Т- и В-лимфоцитов периферической крови проводили в реакции розеткообразования с отмытыми эритроцитами барана.

Под наблюдением находилось 35 пациентов (20 мужчин и 15 женщин), средний возраст которых составлял 51 год, клинический диагноз – хронический генерализованный пародонтит средней степени тяжести был установлен в соответствии с действующими в настоящее время критериями.

Отбор проб для бактериологических исследований проводили установленным порядком. Идентификацию выделенных микроорганизмов осуществляли после получения чистых культур по морфологическим, культуральным, биохимическим и антигенным признакам с использованием идентификационных наборов.

Статистическую обработку осуществляли с помощью пакетов компьютерных программ Microsoft Office Excel 2007 и “Statistica 6.0”. Результаты представлены в виде средней арифметической (М) и средней ошибки среднего арифметического (m). Использовали метод дисперсионного анализа (ANOVA). Оценку нормальности распределения полученных данных проводили по методу Колмогорова-Смирнова. Для оценки достоверности межгрупповых различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни и параметрический F-критерий Фишера в зависимости от нормальности распределения данных. Проверку статистических гипотез осуществляли при критическом уровне значимости  $p < 0,05$ . В ряде случаев для сравнения зависимых выборок использовали непараметрический W-критерий Вилкоксона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Из значительного количества (56 видов) выделенных и идентифицированных видов микроорганизмов как аэробов, так и анаэробов, для дальнейших исследований были выбраны, наиболее распространенные и типичные для данного заболевания виды: стафилококки (2 вида), стрептококки (3 вида), кишечная палочка, грибы, вейлонеллы, актиномицеты, псевдомонады, фузобактерии, трепонемы, нейсерии, протей, Таблица 1.

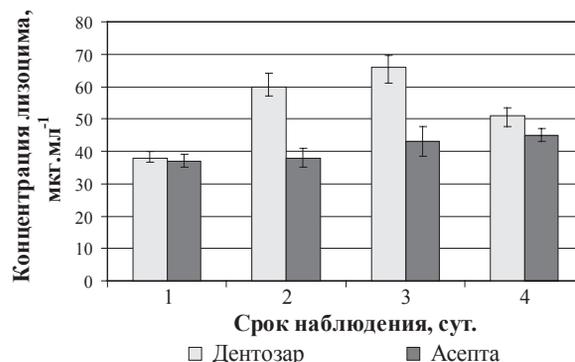


Рисунок 1. Динамика изменения уровня лизоцима в слюнной жидкости (n=4).

Примечание: \* – достоверные ( $p < 0,05$ ) по U-критерию Манна-Уитни различия в группе «Дентозар» по отношению к группе «Асепта».

**Таблица 1.** Оценка антагонистической активности эликсира дентозар в отношении наиболее типичных видов микроорганизмов, выделенных из ротовой полости больных хроническим генерализованным пародонтитом средней тяжести ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )

№, п/п	Вид микроорганизма	Размеры зоны подавления роста, мм	№, п/п	Вид микроорганизма	Размеры зоны подавления роста, мм
1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	30,8±1,6*	8.	<i>Veillonella parvula</i>	29,3±1,6*
2.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	более 351 *	9.	<i>Neisseria spp.</i>	29,2±1,6*
3.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	25,2±1,8*	10.	<i>Actinomyces spp.</i>	24,5±1,7*
4.	<i>Streptococcus haemolyticus</i>	25,7±1,8*	11.	<i>Treponema macrodentium</i>	20,6±1,3*
5.	<i>Streptococcus mutants</i>	26,4±1,9*	12.	<i>Fusobacterium polymorphum</i>	22,4±1,5*
6.	<i>Escherichia coli</i>	более 35*	13.	<i>Proteus vulgaris</i>	более 35*
7.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23,0±1,4*	14.	<i>Candida albicans</i>	33,6±2,1*
15.	Контроль (стерильное вазелиновое масло)				0,01±0,00

**Примечания:** Величина зоны подавления, равная 35 мм и более свидетельствовало о максимальном уровне антагонистической активности; \* – достоверные ( $p < 0,05$ ) различия по U-критерию Манна-Уитни по отношению к группе «Контроль (стерильное вазелиновое масло)».

**Таблица 2.** Динамика изменения уровня иммуноглобулинов ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

№, п/п	Исследуемые показатели, $мг \times см^{-3}$	У больных до лечения	У больных, которым был назначен дентозар					
			сроки наблюдения, сутки					
			1		7		14	
1.	sIg A	0,2±0,1	0,25±0,1	0,31±0,2*	0,36±0,3*	0,2±0,1	0,22±0,2	0,23±0,1
2.	Ig A	0,45±0,12	0,54±0,08	0,55±0,01*	0,59±0,07*	0,44±0,1	0,45±0,11	0,43±0,09
3.	Ig M	0,31±0,09	0,54±0,11*	0,36±0,07	0,28±0,08	0,30±0,11	0,29±0,2	0,29±0,1
4.	Ig G	2,12±0,13	2,15±0,1	2,40±0,02	2,45±0,1	2,0±0,11	2,2±0,12	2,1±0,08

**Примечание:** \* – достоверные ( $p < 0,05$ ) по W-критерию Вилкоксона различия в группах «1, 7 и 14-сутки» по отношению к контролю «До лечения».

На следующем этапе исследований группе больных назначали комплекс БАВ, который применяли аэрозольным способом 4 раза в сутки на протяжении 7 дней. Контрольную группу составили 10 человек в возрасте от 45 до 60 лет, которые для лечения использовали коммерческое гигиеническое средство асепта.

Динамика изменения концентрации лизоцима в слюнной жидкости больных хроническим генерализованным пародонтитом средней тяжести представлена на **Рисунке 1**.

Результаты лабораторных исследований по оценке изменения уровня иммуноглобулинов sIg A, а также Ig A, M, G в слюнной жидкости больных хроническим генерализованным пародонтитом средней тяжести представлены в **Таблице 2**.

Ниже приводим также результаты экспериментальных исследований по изучению частоты выделения различных видов микроорганизмов до и после применения комплекса БАВ, **Таблица 3**.

**Таблица 3.** Динамика изменения концентрации условно-патогенных микроорганизмов у больных хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести  $M \pm m$ ,  $n=6$ )

№, п/п	Вид микроорганизма	Частота выделения, %		№, п/п	Вид микроорганизма	Частота выделения, %	
		До лечения	После лечения			До лечения	После лечения
1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	55,72±3,86	12,90 ±1,72*	9.	<i>Neisseria spp.</i>	12,44 ±1,76	2,08 ±0,24*
2.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	35,88±2,92	15,67 ±1,80*	10.	<i>Actinomyces spp.</i>	55,72 ±3,83	1,16 ±0,17*
3.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	12,04 ±1,76	0,01 ±0,00*	11.	<i>Treponema macrodentium</i>	2,84 ±0,53	0,01 ±0,00*
4.	<i>Streptococcus haemolyticus</i>	20,38 ±2,03	5,06±1,31*	12.	<i>Fusobacterium polymorphum</i>	56,93 ±4,03	1,52 ±0,18*
5.	<i>Streptococcus mutants</i>	18,25 ±1,92	8,59 ±1,48*	13.	<i>Proteus vulgaris</i>	5,10 ±1,35	0,01 ±0,00*
6.	<i>Escherichia coli</i>	3,16 ±1,63	0,01 ±0,00*	14.	<i>Candida albicans</i>	69,81 ±4,52	10,26 ±1,64*
7.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,67 ±1,69	0,01 ±0,00*	15.	<i>Lactobacillus spp.</i>	65,42 ± 4,46	80,19 ±5,91*
8.	<i>Veillonella parvula</i>	70,22 ±4,63	8,16 ±0,52*				

**Примечание:** \* — достоверные ( $p < 0,05$ ) по W-критерию Вилкоксона различия по отношению к контролю «До лечения».

## ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из анализа экспериментальных данных, представленных в **Таблице 1**, разработанный экспериментальный образец комплекса БАВ объективно обладает достаточно высоким уровнем антагонистической активности в отношении различных типичных представителей аэробной и анаэробной микрофлоры полости рта больных хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести. Наибольшая степень подавления роста установлена для таких видов, как: *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Veillonella parvula*, *Neisseria spp.*

Данные **Рисунка 1** показывают, что у больных, которым был назначен экспериментальный образец комплекса БАВ, наблюдается существенное увеличение в слюнной жидкости концентрации лизоцима. Уровень данного фермента, который, как известно, играет в организме роль неспецифического антибактериального барьера, закономерно возрастал, начиная с первых дней приема комплекса БАВ (максимум его достигал на 7–14 сутки и постепенно снижался к 21-м суткам).

Как видно из данных **Таблицы 2** назначение комплекса БАВ сопровождалось увеличением уже на первые сутки концентрации sIgA и IgA,

хотя в большей степени это наблюдалось на 7 и 14 сутки. Установлено также и значительное повышение IgM (в первые сутки после применения экспериментального образца).

Экспериментальные данные, представленные в **Таблице 3** свидетельствуют о существенном снижении количества и частоты выделения условно-патогенной микрофлоры, наиболее характерной для хронического генерализованного пародонтита средней степени тяжести.

В целом, полученные результаты свидетельствуют об определенных положительных иммунологических сдвигах у больных, принимавших в качестве профилактического средства комплекс БАВ.

Экспериментальные данные свидетельствуют о существенном снижении количества и частоты выделения условно-патогенной микрофлоры, наиболее характерной для хронического генерализованного пародонтита средней степени тяжести.

Наблюдается полное вытеснение или снижение до физиологических значений концентраций таких значимых для данной болезни видов микроорганизмов, как *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Treponema macrodentium*, *Streptococcus*

*haemolyticus*, *Streptococcus mutants*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Fusobacterium polymorphum*, *Neisseria spp.*, *Actinomyces spp.*

Существенное положительное терапевтическое значение имеет увеличение количества микроорганизмов рода *Lactobacillus* до 80%.

### ВЫВОДЫ

1. Предлагаемый экспериментальный образец комплекса БАВ – Детозар оказался безопасным для применения и обладал выраженным положительным клинико-терапевтическим эффектом.

2. Экспериментальный образец комплекса БАВ нормализует микробиоценоз ротовой полости и сопровождается снижением количества условно-патогенной микрофлоры и повышением концентрации представителей нормальной микрофлоры.

3. Комплекс БАВ обладает высокой антагонистической активностью в отношении различных видов условно-патогенных микроорганизмов, выделяемых у больных пародонтитом.

4. Экспериментальный образец комплекса БАВ способствует повышению активности лизоцима слюнной жидкости и иммуноглобулинов А и G.

Работа выполнена по теме из Плана НИР ИИФ УрО РАН, № гос. регистрации АААА-А18-118020690020-1.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Забокрицкий Н.А.* Экспериментальная оценка коррекции гуморального иммунитета гепатопротек-

торным препаратом гепатобиол у лабораторных животных с острым токсическим гепатитом. *Российский иммунологический журнал*, 2017, 11, 2(20), 123–126. [*Zabokritskiy N. A.* Experimental estimation of correction of humoral immunity hepatoprotective drug hepatobiol in laboratory animals С acute toxic hepatitis, 2017, 11, 2(20), 123–126].

2. *Забокрицкий Н.А.* Оценка иммуностропного действия пробиотика бацилакт в составе трансдермальных терапевтических систем. *Российский иммунологический журнал*, 2017, 11, 2(20), 126–129. [*Zabokritskiy N. A.* Preclinical evaluation of immunotropic action of probiotics bacilack transdermal therapeutic system, 2017, 11, 2(20), 126–129].
3. *Забокрицкий Н.А.* Обоснование направлений в разработке и экспериментальном изучении новых фармакологических препаратов на основе пробиотиков и их биологически активных продуктов: автореф. дис. ... д-ра. мед. наук., 2014. 3–16. [*Zabokritskiy N. A.* Study areas in the development and experimental study of new pharmacological products based on probiotics and their bioactive products: abstract of dis. ... dr. med. sciences, 2014. 3–16].
4. *Лабинская А.С.* Микробиология с техникой микробиологических исследований. Бином, М., 2012. 72–124. [*Labinskaya A. S.* Microbiology with technique of microbiological studies.: Binom, Moscow, 2012. 72–124].
5. *Holzapfel W. H., Schillinger U.* Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International* 35, 2002, 109–116.
6. *Kailasapathy K. A., Chin J.* Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Immunol. Cell. Biol.*, 2000, 78, 80–88.
7. *Lee Y. K., Salminen S.* Handbook of Probiotics and Prebiotics. John Wiley and Sons, Ltd., 2009, 132–144.
8. *Russel J., Cohn R.* Probiotics. U.K., Edinburgh: LEN-NEX Corp. 2012, 5–58.

## IMMUNOBIOLOGICAL ASPECTS OF THE APPLICATION OF THE NEW METABIOTICS

© 2019 N. A. Zabokritskiy

*E-mail: pharmusma@rambler.ru*

*Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg, Russia*

**Received:** 23.05.2019. **Accepted:** 28.06.2019

The paper presents the results of clinical and laboratory studies of a new metabiotic drug based on biologically active substances of the probiotic strain *Bacillus subtilis B-3679*. The assessment of the state and dynamics of changes in such integral immunological parameters characterizing the state of health of patients as the level of lysozyme activity and the concentration of sIgA, and IgA, M, G in salivary fluid of patients with chronic generalized periodontitis of moderate severity is given. It was found that the metabiotic was safe for use and had a pronounced positive clinical and therapeutic effect, normalizes the microbiocenosis of the oral cavity, which is accompanied by a decrease in the number of opportunistic microflora and an increase in the concentration of representatives of normal microflora. It was experimentally established that the studied metabiotic has a high antagonistic activity against various types of opportunistic microorganisms secreted in patients with periodontitis and promotes increased activity of salivary fluid lysozyme and immunoglobulins A and G.

*Key words:* metabiotic, *Bacillus subtilis B-3679*, immunological parameters

**Author:**

**Zabokritskiy N. A.**, MD, PhD, assistant professor of the laboratory of immunophysiology and immunopharmacology of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia.

Yekaterinburg, Institute of immunology and physiology, Ural branch of the Russian Academy of Sciences. Phone: +73433740070,

**E-mail:** pharmusma@rambler.ru

## ВЛИЯНИЕ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА НА ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ АКТИВИРОВАННЫХ Т-ХЕЛПЕРОВ

© 2019 г. С. А. Заморина<sup>1\*</sup>, Л. С. Литвинова<sup>2</sup>, Н. М. Тодосенко<sup>2</sup>,  
В. П. Тимганова<sup>1</sup>, М. С. Бочкова<sup>1</sup>, К. Ю. Шардина<sup>1</sup>,  
П. В. Храмцов<sup>1</sup>, М. Б. Раев<sup>1</sup>, В. А. Черешнев<sup>1</sup>

\*E-mail: mantissa7@mail.ru

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия;

<sup>2</sup>Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

Поступила: 27.05.2019. Принята: 30.06.2019

Изучали влияние альфа-фетопротеина (АФП) на провоспалительный цитокиновый профиль Т-хелперов, поляризованных в фенотип Th17. Установлено, что АФП не влиял на уровень IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-17, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , но в высоких концентрациях (50, 100 МЕ/мл) повышал продукцию IL-2 активированными Th17. В то же время, АФП в высокой концентрации (100 МЕ/мл) подавлял синтез IFN- $\gamma$ , а в низкой концентрации (10 МЕ/мл) – синтез G-CSF и GM-CSF. Таким образом, продемонстрированы новые аспекты действия АФП в отношении регуляции цитокиновой сети.

**Ключевые слова:** альфа-фетопротеин, беременность, CD4<sup>+</sup>- лимфоциты, ИЛ-17, Т-хелперы 17 типа (Th17), Т-хелперы 1 типа (Th1)

DOI: 10.31857/S102872210007246-5

**Адрес:** Пермь, Голева, 13, 614081, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Заморина Светлана Анатольевна. Тел.: +7(342)280–77–94.

**E-mail:** mantissa7@mail.ru

### Авторы:

**Заморина С. А.**, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия;

**Литвинова Л. С.**, д.м.н., заведующая базовой лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», Калининград, Россия;

**Тодосенко Н. М.**, к.б.н., научный сотрудник Базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», Калининград, Россия;

**Тимганова В. П.**, к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия;

**Бочкова М. С.**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия;

**Шардина К. Ю.**, инженер лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия;

**Храмцов П. В.**, к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», доцент кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия;

**Раев М. Б.**, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии «ИЭГМ УрО РАН», профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия;

**Черешнев В. А.**, академик РАН, д.м.н., в.н.с. лаборатории экологической иммунологии «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Во время беременности иммунная система матери подвергается аллоиммунизации фетоплацентарными антигенами. В результате формируется динамическое состояние иммунной толерантности, в поддержании которого важную роль играют белки, ассоциированные с беременностью. Альфа-фетопротеин (АФП) – одноцепочечный гликопротеин (M<sub>r</sub> 68–75 кДа, 3–5% углеводов), который синтезируется в период раннего развития эмбриона в желточном мешке, а затем в печени и желудочно-кишечном

тракте плода. Во время беременности концентрация АФП в крови растет, достигая значений 150–250 МЕ/мл, после родов его уровень резко снижается [1].

АФП способен проникать через фетоплацентарный барьер в материнский кровоток, при этом часть его молекул (около 10%) меняет свою конформацию, становясь так называемым трансформированным АФП (tAFP) [2]. tAFP обладает структурной особенностью, связанной с частичным разворачиванием нативной полноразмерной молекулы, вследствие чего появляется скрытый пептидный эпитоп. В сыворотке беременных женщин идентифицированы полноразмерный АФП и tAFP [2], взаимодействующие с клетками иммунной системы. Независимо от того, что иммуносупрессивные эффекты АФП известны, его роль в формировании иммунной толерантности в период беременности остается мало изученной [3]. В частности, до сих пор не исследована роль АФП в регуляции функций и дифференцировки провоспалительной субпопуляции IL-17-продуцирующих Т-хелперов (Th17). Известно, что физиологическая беременность сопровождается снижением Th17 в периферической крови в сравнении с небеременными женщинами [4]. Повышение уровня Th17, в свою очередь, ассоциировано с патологическими процессами и может приводить к преждевременным родам или спонтанному аборту [5]. IL-17, являясь основным цитокином Th17, вызывает синтез IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 и ряда других воспалительных факторов, инициируя, таким образом, развитие воспалительной реакции. Известно, что IL-17 играет важную роль в патофизиологии ревматоидного артрита [6], а во время беременности симптомы этого заболевания становятся менее выраженными.

Таким образом, целью работы являлась оценка влияния АФП на цитокиновый профиль Т-хелперов, индуцированных в фенотип Th17.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в соответствии с Хельсинской Декларацией ВМА 2000 г. и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., на используемую экспериментальную схему получено разрешение Этического комитета «ИЭГМ УрО РАН» (IRB00010009) от 12.06.2016. В работе использовали мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) доноров, которыми являлись здоровые небеременные женщины репродук-

тивного возраста (n=11). Клетки получали центрифугированием в градиенте плотности фикола-верографина (d = 1,077 г/см<sup>3</sup>). Монокультуры CD4<sup>+</sup>-клеток (Т-хелперы) получали методом иммуномагнитной сепарации с использованием технологии MACS<sup>®</sup> (“Miltenyi Biotec”, Германия) из суспензии МПК. После сепарации в полученных монокультурах Т-хелперов подтверждали отсутствие моноцитов (CD14<sup>+</sup>), NK-клеток (CD16<sup>+</sup>) и В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>). Выделенные Т-хелперы культивировали в 96-луночных планшетах (концентрация 10<sup>6</sup> клеток/мл) в полной питательной среде (ППС), содержащей RPMI-1640 с L-глутамином, (“Sigma-Aldrich”, США), 10% ЭТС (“Sigma-Aldrich”), 10 мМ Hepes (“Amresco”, США) и 30 мкг/мл гентамицина (“KRKA”, Словения), в течение 48 ч при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. В качестве контроля использовали образец, где вместо белка добавляли ППС. В работе использовали физиологические концентрации (10, 50 и 100 МЕ/мл [7]) нативного (не рекомбинантного) препарата АФП (“Биалекса”, Россия), полученного из сыворотки крови беременных женщин. Эти концентрации АФП соответствовали таковым в периферической крови матери в динамике беременности. В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали Т-Cell Activation/Expansion Kit human (TCR-активатор) (“Miltenyi Biotec”) – частицы MACSiBead<sup>™</sup>, покрытые антителами к CD2, CD3, CD28 человека. Для индукции лимфоцитов в фенотип Th17 в культуры вносили рекомбинантные цитокины IL-1 $\beta$  и IL-6 (по 10 нг/мл, «Miltenyi Biotec», Германия) [8]. Конверсию клеток в Th17 подтверждали, оценивая уровень экспрессии транскрипционного фактора ROR- $\gamma$ t [9] методом проточной цитометрии. Было установлено, что под воздействием TCR-активатора и провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$  и IL-6) количество Th17-клеток составляло 77,90 $\pm$ 8,30% против 1,14 $\pm$ 0,97 (n=11) в пробах без активаторов.

После 48 ч инкубации методом проточной флуориметрии (мультиплексный анализ, Luminex xMAP) в супернатантах культур Th17-клеток определяли содержание следующих цитокинов и хемокинов: IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ . Метод представляет собой мультиплексную иммунную реакцию, протекающую на микрочастицах, на которых сорбированы соответствующие антитела, с их последующим проточным флуоресцентным

анализом и одновременным определением концентрации исследуемых цитокинов. Процедуры осуществляли согласно протоколу “Bio-Plex Pro Human Th17 Cytokine Panel”. Результаты регистрировали с помощью автоматического фотометра для микропланшетов Bio-Plex (Bio-Plex® 200 Systems, “Bio-Rad”, США) и программы Bio-Plex Manager (“Bio-Rad”). Статистическую обработку данных проводили с помощью программы STATISTICA 8.0. Достоверность разли-

чий оценивали при помощи парного критерия Вилкоксона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки эффектов АФП на продукцию цитокинов Т-хелперами использовали активационную модель, которая имитирует процесс взаимодействия Т-лимфоцитов с антиген-презентирующими клетками (АПК) в присутствии

**Таблица 1.** Влияние АФП на продукцию цитокинов и хемокинов активированными Т-хелперами (n=11)

Цитокины/ хемокины, пг/мл	Контроль (без активаторов)	Контроль	АФП 10 МЕ/мл	АФП 50 МЕ/мл	АФП 100 МЕ/мл
		(+TCR-активатор; +IL-1 $\beta$ и IL-6)			
IL-2	5,13 (2,85–9,92)	335,63 (245,64–442,40)*	466,42 (261,81–1097)	872,52 (449,52–1271)#	867,62 (301,39–1616)#
IL-4	0,29 (0,15–0,41)	11,70 (10,66–13,06)*	12,78 (11,36–13,48)	12,31 (11,93–13,75)	13,31 (12,19–13,95)
IL-5	7,05 (5,59–14,76)	275,23 (255,28–292,34)*	301,86 (280,97–346,64)	285,92 (274,07–328,66)	281,29 (266,54–361,13)
IL-7	0,55 (0,25–0,55)	2,44 (2,08–2,63)*	2,47 (2,22–2,83)	2,63 (1,79–3,19)	2,32 (2,09–2,63)
IL-8	2088 (1562–2412)	2568 (1774–3204)	2048 (1685–2892)	2546 (1793–3721)	2274 (1773–3727)
IL-10	5,65 (3,20–9,54)	1125 (968–1605)*	1652 (865–756)	1581 (1426–1720)	1642 (919–1874)
IL-12(p70)	3,10 (2,30–4,39)	7,18 (6,19–8,15)*	8,86 (7,41–9,70)	7,89 (6,84–9,08)	7,97 (7,18–9,00)
IL-13	0,46 (0,37–0,63)	360,56 (301,15–506,65)*	414,66 (327,31–539,86)	486 (309–1193)	389,33 (298,80–1193)
IL-17	8,89 (6,34–11,59)	7836 (6093–8037)*	7986 (7675–8135)	7996 (7213–809)	7968 (4087–8098)
G-CSF	9,75 (5,76–17,83)	35,45 (25,44–42,35)*	24,73 (16,66–29,69)#	35,23 (29,24–39,32)	30,15 (25,72–40,34)
GM-CSF	0,92 (0,53–1,90)	651,87 (524,99–786,04)*	453,11 (367,75–525,29)#	487,65 (433,28–601,59)	542,61 (416,70–1008,52)
IFN- $\gamma$	1,12 (0,77–2,09)	987,56 (746,74–1142,26)*	1153 (857–1173)	1136 (781–1183)	800,66 (768,06–1075)#
MCP-1	42,12 (41,58–65,42)	39,62 (37,53–43,76)	43,10 (39,70–47,51)	46,13 (37,77–50,55)	40,04 (38,95–51,81)
MIP-1 $\beta$	166,53 (113,57–206,53)	1844 (1702–1878)*	1881 (1863–1899)	1879 (1862–1908)	1890 (1877–1917)
TNF- $\alpha$	55,69 (36,22–166,80)	7357 (6550–11423)*	7689 (5051–14807)	7617 (5586–14886)	8846 (5219–15005)

**Примечание:** данные представлены в виде Ме (Q1 – Q3); \* – достоверные ( $p < 0,05$ ) по  $w$ -критерию Вилкоксона различия между контролем без активатора и контролем с активаторами; # – достоверные ( $p < 0,05$ ) по  $W$ -критерию Вилкоксона различия между контролем с активаторами и пробами с АФП.

провоспалительных цитокинов (IL1 $\beta$ +IL6) [8]. Взаимодействие Т-хелперов с TCR-активатором, заменяющим в системе *in vitro* АПК, инициирует такие процессы, как активация, дифференцировка и продукция цитокинов. Показано, что самостоятельный эффект активации клеток заключался в достоверном повышении продукции следующих цитокинов: IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  (Таблица 1), что свидетельствует об адекватности выбранной экспериментальной модели.

При анализе цитокинового профиля было установлено, что АФП не влиял на IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-17, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ . Однако, показано, что АФП в концентрациях 50 и 100 МЕ/мл стимулировал продукцию IL-2 активированными Т-хелперами. Помимо этого, низкая концентрация АФП (10 МЕ/мл) снижала продукцию колониестимулирующих факторов G-CSF и GM-CSF, а высокая концентрация АФП (100 МЕ/мл) — продукцию IFN- $\gamma$  (Таблица 1).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что клеточные культуры активированных Т-хелперов более чем на 70% состояли из Th17 клеток (CD4<sup>+</sup>ROR- $\gamma$ t<sup>+</sup>), существует вероятность, что часть цитокинов продуцируется Th1-клетками. Именно поэтому корректнее говорить в цитокиновом профиле активированных Т-хелперов. Итак, АФП в концентрациях 50 и 100 МЕ/мл стимулировал продукцию IL-2 активированными Т-хелперами. Известно, что активация Т-лимфоцитов тесно связана с аутокринной продукцией IL-2, который запускает пролиферацию Т-клеток и их дифференцировку. Важно отметить, что IL-2 необходим для развития Т-регуляторных лимфоцитов (Treg), увеличение количества которых ассоциировано с успешной беременностью [10]. Современная парадигма предполагает преобладание Treg над Th17 во время нормальной беременности, что необходимо для обеспечения фетопротекции [11]. Помимо этого, снижение продукции IFN- $\gamma$ , ключевого цитокина Th1-ответа, также способствует формированию противовоспалительного цитокинового профиля. По-видимому, повышение уровня IL-2, и снижение уровня IFN- $\gamma$  под воздействием АФП может играть важную роль в процессе формирования иммунной толерантности.

В то же время, GM-CSF вовлечён в обеспечение имплантации и прогрессирования бере-

менности *in vivo*, и его экспрессия повышается в матке и в сыворотке в период оплодотворения, имплантации и на ранних сроках беременности. Экспрессия GM-CSF запускается хорионическим гонадотропином [12], основным гормоном беременности плацентарного происхождения. АФП, наряду с другими белками беременности, по-видимому, осуществляет реципрокную регуляцию синтеза GM-CSF.

Важно отметить, что в данной работе мы изучали нативный препарат АФП, полученный из крови беременных женщин, что позволяет интерпретировать полученные данные как роль сывороточного АФП в формировании периферической иммунной толерантности на уровне организма матери. В частности, нами впервые показано, что АФП участвует в регуляции цитокинового профиля активированных Т-хелперов, повышая уровень IL-2 и снижая уровень IFN- $\gamma$ . Вероятно, данные изменения в ситуации *in vivo* ведут к формированию необходимого для нормальной беременности преобладания Treg над Th17. В итоге, полученные данные демонстрируют новые аспекты регуляции цитокиновой сети со стороны АФП.

### ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований впервые показано, что АФП участвует в регуляции цитокинового профиля активированных Т-хелперов, повышая уровень IL-2 и снижая уровень IFN- $\gamma$ . Обнаруженные нами эффекты свидетельствуют о том, что сывороточный АФП участвует в формировании периферической иммунной толерантности матери к полуаллогенному эмбриону.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы: 01201353248 («ИЭГМ УрО РАН»), программы повышения конкурентоспособности (5–100) и субсидии «Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/ВУ» БФУ им. И. Канта.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Terentiev A. A., Moldogazieva N. T. Alpha-fetoprotein: A renaissance. *Tumor Biol.* 2013. V. 34. P. 2075–2091.
2. González-Bugatto F., Foncubierta E., Bailén Mde L., Illanes S., Hervías-Vivancos B., Bartha J. L. Maternal and fetal serum transformed alpha-fetoprotein levels in normal pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2009. V. 35(№ 2). P. 271–276.
3. Schumacher A., Costa S. D., Zenclussen A. C. Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy. *Front. Immunol.* 2014. doi: 10.3389/fimmu.2014.00196

4. Santner-Nanan B., Peek M.J., Khanam R., Richards L., Zhu E., Fazekas de St. Groth. B., Nanan R. Systemic increase in the ratio between Foxp3<sup>+</sup> and IL-17-producing CD4<sup>+</sup> T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. J. Immunol. 2009. V. 183, № 11. P. 7023–30.
5. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. Am. J. Reprod. Immunol. 2010. V.601, № 63. 601–610.
6. Xie Q., Wang S. C., Li J. IL-17: a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 2012. № 7. P.1145–6.
7. Gagnon A., Wilson R. D., Audibert F., Allen V.M., Blight C., Brock J.A., Desilets V.A., Johnson J. A., Langlois S., Summers A., Wyatt P. Obstetrical Complications Associated With Abnormal Maternal Serum Markers Analytes. J. of Obstetrics and Gynaecology Canada. 2008. V. 30. P. 918–932.
8. Acosta-Rodriguez E.V., Napolitani G., Lanzavecchia A., Sallusto F. Interleukins 1β and 6 but not transforming growth factor-β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. Nat. Immunol. 2007. V. 8, № 9. P. 942–9.
9. Ivanov I. I., McKenzie B. S., Zhou L., Tadokoro C. E., Lepelley A., Lafaille J. J., Cua J., Littman D. R. The orphan nuclear receptor ROR γt directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. Cell. 2006 V. 126, № 6, P. 1121–1133.
10. Schumacher A., Brachwitz N., Sohr S., Engeland K., Langwisch S, Dolaptchieva M., Alexander T., Taran A., Malfertheiner S. F., Costa S. D., Zimmermann G., Nitschke C., Volk H. D., Alexander H., Gunzer M., Zenclussen A. C. Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal/maternal interface during early human pregnancy. J Immunol. 2009. V.9. P. 5488–5497.
11. Figueiredo A. S., Schumacher A. The T helper type 17/ regulatory T cell paradigm in pregnancy. Immunology. 2016 V.148, № 1, P. 13–21. doi: 10.1111/imm.12595.
12. Paiva P., Hannan N.J., Hincks C., Meehan K. L., Pruysers E., Dimitriadis E., Salamonsen L.A. Human chorionic gonadotrophin regulates FGF2 and other cytokines produced by human endometrial epithelial cells, providing a mechanism for enhancing endometrial receptivity. Hum. Reprod. 2011. V. 11. P. 1153–1162. doi: 10.1093/humrep/der027

## INFLUENCE OF ALPHA-FETOPROTEIN ON CYTOKINE PROFILE OF ACTIVATED T-HELPERS

© 2019 S. A. Zamorina<sup>1\*</sup>, L. S. Litvinova<sup>2</sup>, N. M. Todosenko<sup>2</sup>, V. P. Timganova<sup>1</sup>, M. S. Bochkova<sup>1</sup>, K. Y. Shardina<sup>1</sup>, P. V. Khrantsov<sup>1</sup>, M. B. Raev<sup>1</sup>, V. A. Chereshev<sup>1</sup>

\*E-mail: mantissa7@mail.ru

<sup>1</sup>«Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch Russian Academy of Sciences», Perm, Russia;

<sup>2</sup>Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

Received: 27.05.2019. Accepted: 30.06.2019

The effect of alpha-fetoprotein (AFP) on the pro-inflammatory cytokine profile of activated T-helpers, polarized in phenotyp of Th17. It was found that AFP did not affect the level of IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-17, MCP-1, MIP-1α, TNF-α, but in high concentrations (50, 100 IU/ml) increased IL-2 production by activated T-helper cells. At the same time, AFP in high concentration (100 IU/ml) suppressed the synthesis of IFN-γ, and in low (10 IU/ml) synthesis of G-CSF and GM-CSF. Thus, new aspects of the AFP action regarding the regulation of the cytokine network of Th17 are demonstrated.

*Key words:* alpha-fetoprotein (AFP), T-helper, Th17, Th1, cytokines profiles, pregnancy

**Authors:**

**Zamorina S. A.**, ✉ Ph.D., MD (Biology), leading researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», professor of the department of microbiology and immunology of the Perm State University's Faculty of Biology, Perm, Russia;

614081, Perm, st. Goleva, 13, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS». Phone: +7 (342) 280-77-94.

**E-mail:** mantissa7@mail.ru.

**Litvinova L. S.**, PhD, MD (Medicine), Head, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Todosenko N. M.**, PhD (Biology), Researcher, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

**Timganova V. P.**, Ph.D. (Biology), junior researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», Perm, Russia;

**Bochkova M. S.** Ph.D. (Biology), researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», Perm, Russia;

**Shardina K. Y.** researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», Perm, Russia;

**Khramtsov P. V.**, Ph.D. (Biology), researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», assistant professor of the department of microbiology and immunology of the Perm State University's Faculty of Biology, Perm, Russia;

**Rayev M. B.**, Ph.D., MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Ecological Immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», professor of the department of microbiology and immunology of the Perm State University's Faculty of Biology, Perm, Russia;

**Chereshnev V. A.**, Academician of the Russian Academy of Sciences, MD, Chief Researcher of the Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia.

## ОЦЕНКА ЦИТОКИНОПОДОБНОЙ АКТИВНОСТИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ СТАФИЛОКОККОВОГО БЕЛКА А

© 2019 г. А. В. Зурочка<sup>1,2\*</sup>, В. А. Зурочка<sup>1,2</sup>, Л. О. Фомина<sup>1</sup>,  
А. И. Файзуллина<sup>1</sup>, М. А. Добрынина<sup>1</sup>, В. А. Гриценко<sup>3</sup>

\*E-mail: av\_zurochka@mail.ru

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии образования, Екатеринбург, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет  
(национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия;

<sup>3</sup>ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, Россия

Поступила: 17.05.2019. Принята: 27.06.2019

В работе изучена продукция цитокиноподобных веществ у 5 штаммов *Staphylococcus aureus*, имеющих и не имеющих генетические детерминанты стафилококкового белка А (ген *spa*). Ген *spa* у *S. aureus* определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Цитокиноподобную активность супернатантов суточных бульонных культур *S. aureus* определяли при помощи иммунофлюоресцентных тест-систем компании Multiplex (Luminex, США) (G-CSF, GM-CSF, INF- $\gamma$ , IL-1Ra, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17a, TGF $\alpha$ , MCP1, MIP1b, TNF- $\alpha$ ) на приборе MAGPIX-100 (США). Установлено, что не зависимо от наличия или отсутствия генетических маркеров белка А стафилококков в супернатантах изученных штаммов *S. aureus* выявлялись цитокино-подобные вещества. Таким образом, цитокиноподобная активность *S. aureus* не зависит от наличия у бактерий гена *spa*, ответственного за продукцию стафилококкового белка А.

**Ключевые слова:** *S. aureus*, цитокины, цитокиноподобные вещества, ген *spa*

DOI: 10.31857/S102872210007247-6

**Адрес:** Екатеринбург, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Зурочка Александр Владимирович.

Тел.: +79193077598. E-mail: av\_zurochka@mail.ru

### Авторы:

**Зурочка А. В.**, д.м.н., профессор кафедры пищевых и биотехнологий, ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

**Зурочка В. А.**, д.м.н., профессор кафедры пищевых и биотехнологий, ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет», Челябинск, Россия; старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

**Фомина Л. О.**, аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии образования, Екатеринбург, Россия;

**Файзуллина А. И.**, аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии образования, Екатеринбург, Россия;

**Добрынина М. А.**, младший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

**Гриценко В. А.**, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Ранее в наших исследованиях было показано, что в суспензиях суточных культур бактерий разных видов с помощью тест-систем для мультиплексного анализа разных компаний-производителей (BioRAD и Multiplex) выявляются цитокиноподобные вещества (ЦПВ),

аналогичные цитокинам человека, в широком спектре и различных концентрациях [1, 2]. Среди изученных таксонов микроорганизмов наиболее активными продуцентами ЦПВ являлись бактерии вида *Staphylococcus aureus*, причем часть штаммов выделяли в среду инкубации большое количество ЦПВ (до 21) и в относительно высоких концентрациях, тогда как другие изоляты либо их не секретировали, либо секретировали, но в незначительных количествах.

Учитывая, что многие штаммы *S. aureus* способны синтезировать и секретировать в питательную среду белок А, обладающий способностью неспецифически (через Fc-фрагменты) связываться с иммуноглобулинами G, логично предположить, что такая выраженная цитокиноподобная активность *S. aureus* могла быть связана с его продукцией. В то же время белок А секретруется не всеми штаммами данного вида стафилококков, и его нет у коагулазоотрицательных стафилококков, для которых также была показана цитокиноподобная активность [3].

Этот вопрос становится особенно актуален, если учесть, что недавно в исследованиях зарубежных авторов было установлено, что какие-то продукты отдельных клинических изолятов *S. aureus*, находящиеся в среде культивирования, при постановке ИФА обнаруживают перекрестную реакцию с антителами для мышинных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  [4]. Эта кросс-реакция, которая, по мнению авторов, связана с некоторыми неизвестными продуктами *S. aureus*, взаимодействующими с антителами против мышинных цитокинов, может приводить к получению ложноположительных и завышенных результатов при определении концентрации цитокинов в тестируемых жидкостях. Поэтому важным является вопрос о возможном перекрестном реагировании ЦПВ бактерий с антителами против цитокинов человека, тестируемых иммунофлюоресцентным анализом. Остается не исследованной роль белка А стафилококков в этом процессе.

Указанные обстоятельства определяют повышенный интерес к вопросу, насколько связана цитокиноподобная активность стафилококков с наличием у них генетических детерминант, ответственных за продукции стафилококкового белка А.

**Целью** настоящего исследования явилось сравнительное изучение цитокиноподобной активности у клинических и музейных штаммов *S. aureus*, оппозитных по генетическим маркерам

белка А стафилококков, с помощью тест-систем для мультиплексного иммунофлюоресцентного анализа цитокинов человека.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Продукция ЦПВ была изучена у 5 штаммов *S. aureus*, в том числе эталонного штамма из АТСС № 6538–209Р, имеющего генетический маркер стафилококкового белка А (*spa*), 2 клинических изолятов, у которых ген *spa* не выявлялся – *S. aureus* Г886 и *S. aureus* К33, а также 2 клинических штаммов, несущих генетический маркер белка А – *S. aureus* К39 и *S. aureus* Г885.

Бактерии выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) в течение 24 ч при 37°C, после чего культуры центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 минут и препаративно отбирали фильтрат надосадочной жидкости (супернатант).

Наличие в супернатантах бактерий цитокиноподобных веществ (ЦПВ) определяли иммунофлюоресцентным методом на приборе MAGPIX-100 (США) с использованием тест-системы фирмы Multiplex (Luminex, США) для определения цитокинов (G-CSF, GM-CSF, INF- $\gamma$ , IL-1Ra, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17a, TGF $\alpha$ , MCP1, MIP1b, TNF- $\alpha$ ). Во всех случаях контролем служил МПБ без бактерий.

Наличие гена, ответственного за продукцию стафилококкового протеина А (*spa*), определяли путем постановки ПЦР с использованием многоканального амплификатора и подобранных праймеров [5, 6].

Выделение ДНК осуществляли из бактериальных взвесей (10<sup>8</sup> КОЕ/мл), приготовленных из суточных агаровых культур *S. aureus*, сорбционным методом с использованием набора реактивов «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия) согласно рекомендации производителя.

Обнаружение гена *spa*, ассоциированного с патогенностью *S. aureus* проводили с помощью постановки мультиплексной ПЦР с использованием подобранных праймеров: олигонуклеотидная последовательность (5'→3'), AGCACCAAAAGAGGAAGACAA → GTTTAACGACCGT; размер продукта 200–400 п.н.

Для их подбора, а также оптимальных условий проведения анализа пользовались программой PrimerSelect из пакета программ Lasergene, в том числе – Megaline (Lasergene) (DNASTAR, Inc. США).

Амплификацию проводили с использованием стандартных наборов на многоканаль-

ном амплификаторе «Терцик МС-2» («ДНК-технология», Россия) по следующему протоколу: 1 цикл – 94 °С, 5 мин; 30 циклов: 94 °С, 30 сек; 55 °С, 30 сек; 72 °С, 30 сек; последний цикл – 2 мин при 72 °С. Продукты амплификации анализировали путем электрофоретического разделения в горизонтальном 1,7% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, в ТАЕ буферной системе с использованием стандартных наборов фирмы «ИнтерЛабСервис». В качестве маркеров использовали маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder (ЕвроГен). Положительное заключение о наличии гена делали при обнаружении в дорожке специфической светящейся полосы определенной массы, которую устанавливали по линейке молекулярных масс.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследования показали, что 3 штамма *S. aureus* (из 5 изученных) несли генетические детерминанты синтеза стафилококкового белка А, а 2 клинических изолята не имели гена *spa*. В то же время,

данные, суммированные в **Таблице 1**, свидетельствуют о том, что через 24 часа культивирования бактерий в МПБ при 37 °С в супернатантах всех изученных штаммах *S. aureus* определялись различные цитокины. Более того концентрация определенных ЦПВ у изолятов, не несущих ген *spa*, была даже несколько выше чем у штаммов, имеющих генетические маркеры стафилококкового белка А.

Учитывая, что ранее были получены данные о том, что различными тест-системами как для мультиплексного, так и для иммуноферментного анализов разных фирм производителей у стафилококков определялись ЦПВ [7], возникает вопрос о необходимости выделения этих веществ в чистом виде и их характеристике. Кроме того полученные нами данные свидетельствуют о том, что указанная активность напрямую не связана с наличием у бактерий генетических детерминант, ответственных за секрецию стафилококками белка А, и, по-видимому, имеет другую природу.

**Таблица 1.** Цитокинопродукция суточных культур *S. aureus*, оппозитных по наличию генетического маркера стафилококкового белка А, иммунофлюоресцентным методом (пкг/мл)

Цитокины	<i>S. aureus</i> P209 (spa+)	<i>S. aureus</i> Г 886 (spa-)	<i>S. aureus</i> К 33 (spa-)	<i>S. aureus</i> К 39 (spa+)	<i>S. aureus</i> Г 885 (spa+)
INF $\gamma$	518,0	349,0	741,0	523,0	165,5
TGF $\alpha$	21,1	33,0	41,0	37,0	32,0
IL-1Ra	63,5	Не определяли	49,7	51,9	6,7
IL-1 $\beta$	48,0	22,5	29,0	24,0	20,0
IL-2	65,0	38,0	59,0	47,0	29,0
IL-4	46,0	34,0	39,0	34,0	32,0
IL-5	18,0	13,0	15,0	15,0	13,0
IL-6	53,0	33,0	37,0	32,0	26,0
IL-10	31,0	27,0	24,0	25,0	24,5
IL-12	248,0	77,5	112,0	78,0	38,0
IL-13	30,0	20,0	25,0	23,5	19,0
IL-17a	505,0	291,0	509,0	337,5	154,0
TNF- $\alpha$	0,4	Не определяли	0,5	0,7	0,3
G-CSF	102,0	71,0	109,0	69,5	37,0
GM-CSF	207,5	58,0	82,0	56,5	38,0
MCP1	43,5	42,0	41,0	34	34,0
MIP1b	76,5	50,0	61,0	50	44,0

**Примечание:** (spa+) – есть ген белка А; (spa-) – ген белка А не выявлен.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном исследовании установлено, в супернатантах суточных бульонных культур *S. aureus*, оппозитных по наличию генетических маркеров продукции стафилококкового белка А, определяются «сходные» с цитокинами человека ЦПВ в широком спектре и относительно высоких концентрациях. Немаловажным является факт штаммовой вариабельности цитокино-подобной активности бактерий: в изученной выборке изолятов *S. aureus* имелись штаммы бактерий как с относительно высоким уровнем продукции ЦПВ, так и с более низким уровнем секреции ЦПВ. Продукция (секреция) стафилококками ЦПВ не зависела от наличия или отсутствия у них генетических детерминант (*spa*), ответственных за продукцию белка А. Более того, штаммы, не несущие ген *spa*, секретировали в среду более высокие концентрации некоторых цитокинов по сравнению с оппозитными по данному генетическому маркеру штаммами, или секреция отдельных ЦПВ у них практически была идентичной.

В этой связи необходимо учитывать возможное получение ложно-положительных результатов в жидкостях и выделениях человека при определении уровней в них цитокинов в условиях инфицирования биоматериала *S. aureus*. Это, например, относится к определению цитокинов в слюне, назальном секрете, в секретах кишечника, урогенитального тракта, в гнойном содержимом, при сепсисе (при септицемии и определении уровней цитокинов в крови). Следует также учитывать и уровень ЦПВ стафилококков, вызвавших воспалительный процесс.

## ВЫВОДЫ

1. В супернатантах суточных бульонных культур *S. aureus*, оппозитных по генетическим маркерам белка А стафилококков (*spa*), определяются цитокиноподобные продукты их секреции в широком спектре и концентрациях.

2. Уровень секреции и спектр определяемых цитокиноподобных веществ не зависит от наличия у *S. aureus* генетических детерминант, ответственных за продукцию стафилококкового белка А.

Работа выполнена по теме из Плана НИР ИИФ УрО РАН, № гос. регистрации АААА-А18-118020690020-1, и теме из Плана НИР ИКВС УрО РАН, № гос. регистрации 116021510075.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Зурочка А. В., Дукардт В. В., Зурочка В. А., Добрынина М. А., Зуева Е. Б., Тяпаева Я. В., Гриценко В. А. Бактерии как продуценты цитокиноподобных веществ. Российский иммунологический журнал 2017, 11 (20), 3, 374–376. [Zurochka A. V., Dukardt V. V., Zurochka V. A., Dobrynina M. A., Zuyeva E. B., Tyapayeva Y. V., Gritsenko V. A. Bacteria as producers of cytokine-like substances. Russian journal of immunology 2017, 11 (20), 3, 374–376.]
2. Зурочка А. В., Зурочка В. А., Добрынина М. А., Зуева Е. Б., Тяпаева Я. В., Дукардт В. В., Гриценко В. А. Цитокиновая и антицитокиновая активность стафилококков. Методические особенности. Российский иммунологический журнал 2017, 11 (20), 4, 707–709. [Zurochka A. V., Zurochka V. A., Dobrynina M. A., Zuyeva E. B., Tyapayeva Y. V., Dukardt V. V., Gritsenko V. A. Cytokine and anticytokine activity of staphylococci. Methodical features. Russian journal of immunology. 2017, 11 (20), 4, 707–709.]
3. Зурочка А. В., Дукардт В. В., Зурочка В. А., Добрынина М. А., Зуева Е. Б., Тяпаева Я. В., Гриценко В. А. Стафилококки как продуценты цитокиноподобных веществ. Российский иммунологический журнал. 2017, 11 (20), 2, 134–136. [Zurochka A. V., Dukardt V. V., Zurochka V. A., Dobrynina M. A., Zuyeva E. B., Tyapayeva Y. V., Gritsenko V. A. Staphylococcus as producers of cytokine-like substances. Russian immunological magazine. 2017, 11 (20), 2, 134–136.]
4. Javed N., Xue G., Lu A., Xing Y., Iwakura Y., Xiao H., Lecoeur H., Späth G. F., Meng G. Cross reactivity of *S. aureus* to murine cytokine assays: A source of discrepancy. Cytokine. 2016, 81, 101–108.
5. Гриценко В. А., Мавзютов А. Р., Пашкова Т. М., Карташова О. Л., Тяпаева Я. В., Белозерцева Ю. П. Генетический профиль *Staphylococcus aureus*, выделенных от бактерионосителей и больных с инфекционно-воспалительной патологией. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2018, 4, 56–62. [Gritsenko V. A., Mavzyutov A. R., Pashkova T. M., Kartashova O. L., Tyapayeva Ya. V., Belozertseva Yu. P. Genetics the *Staphylococcus aureus* profile, allocated from bacillicarriers and patients with infectious and inflammatory pathology. J. Microbiol., epidemiol. and immunobiol. 2018, 4, 56–62.]
6. Sabat A., Krzyszton-Russjan J., Strzalka W., Filipek R., Kosowska K., Hryniewicz W., Travis J., Potempa J. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. J. Clin. Microbiol. 2003. 41(4): 1801–1804.
7. Фомина Л. О., Файзуллина А. И., Зурочка В. А., Добрынина М. А., Симбирцев А. С., Гриценко В. А. Сравнительная оценка цитокиноподобной активности *Staphylococcus aureus* мультиплексным и иммуноферментным анализом. Российский иммунологический журнал. 2018, 12 (21), 3, 460–465. [Fomina L. O., Fayzullina A. I., Zurochka V. A., Dobrynina M. A., Simbircev A. S., Gritsenko V. A. Comparative evaluation cytokine-like activity of *Staphylococcus aureus* by methods multiplex and ELISA. Russian immunological magazine. 2018, 12 (21), 3, 460–465.]

**ESTIMATION OF CYTOKIN-LIKE ACTIVITY OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DEPENDING ON THE AVAILABILITY OF GENETIC DETERMINANT OF STYPHYLOCOCCAL PROTEIN A**

© 2019 A. V. Zurochka<sup>1,2\*</sup>, V. A. Zurochka<sup>1,2</sup>, L. O. Fomina<sup>1</sup>,  
A. I. Fayzullina<sup>1</sup>, M. A. Dobrynina<sup>1</sup>, V. A. Gritsenko<sup>3</sup>

\*E-mail: av\_zurochka@mail.ru

<sup>1</sup>Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg, Russia;

<sup>2</sup>South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russia;

<sup>3</sup>Orenburg Federal Research Center UrB RAS, Orenburg, Russia

Received: 17.05.2019. Accepted: 27.06.2019

In this work, the production of cytokine-like substances was studied in 5 strains of *Staphylococcus aureus*, with and without genetic determinants of staphylococcal protein A (*spa* gene). The *spa* gene in *S. aureus* was determined by the polymerase chain reaction (PCR) method. The cytokine-like activity of the supernatants of *S. aureus* daily broth cultures was determined using Multiplex (Luminex, United States) immunofluorescence test systems (G-CSF, GM-CSF, INF- $\gamma$ , IL-1Ra, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17a, TGF $\alpha$ , MCP1, MIP1b, TNF- $\alpha$ ) on a MAGPIX-100 instrument (USA). It was established that, regardless of the presence or absence of genetic markers of staphylococcal protein A, in the supernatants of the studied strains of *S. aureus*, cytokine-like substances were detected. Thus, the cytokine-like activity of *S. aureus* does not depend on the presence in bacteria of the *spa* gene, which is responsible for the production of staphylococcal protein A.

*Key words:* *S. aureus*, cytokines, cytokine-like substances, *spa* gene

**Authors:**

**Zurochka A. V.**, ✉ MD, professor of the Department of food and biotechnology, senior researcher of the laboratory of molecular immunology of the South Ural state University (national research University), Chelyabinsk, Russia; leader scientific researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia.

Yekaterinburg, Institute of immunology and physiology, Ural branch of the Russian Academy of Sciences. Phone: +79193077598, E-mail: av\_zurochka@mail.ru;

**Zurochka V. A.**, MD, professor of the Department of food and biotechnology, senior researcher of the laboratory of molecular immunology of the South Ural state University (national research University), Chelyabinsk, Russia; senior scientific researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

**Fomina L. O.**, post-graduate student of the Institute of immunology and physiology of the Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

**Fayzullina A. I.**, post-graduate student of the Institute of immunology and physiology of the Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

**Dobrynina M. A.**, Junior scientific researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

**Gritsenko V. A.**, MD, Professor, Chief Researcher of Orenburg Federal Research Center UrB RAS, Orenburg, Russia.

## ДЕТЕКЦИЯ ЦИТОКИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИТОКИНОВ МЫШЕЙ У *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ОППОЗИТНЫХ ПО ГЕНУ *SPA*

© 2019 г. А. В. Зурочка<sup>1,2\*</sup>, В. А. Зурочка<sup>1,2</sup>, Л. О. Фомина<sup>1</sup>,  
А. И. Файзуллина<sup>1</sup>, М. А. Добрынина<sup>1</sup>, В. А. Гриценко<sup>3</sup>

\*E-mail: av\_zurochka@mail.ru

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии образования, Екатеринбург, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия;

<sup>3</sup>ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, Россия

Поступила: 18.05.2019. Принята: 29.06.2019

В работе изучена цитокиноподобная активность у 6 штаммов *Staphylococcus aureus*, имеющих и не имеющих генетические детерминанты стафилококкового белка А (ген *spa*). Ген *spa* у *S. aureus* определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Продукция цитокино-подобных веществ в супернатантах суточных бульонных культур *S. aureus* определяли при помощи 8-плексной иммунофлюоресцентной тест-системы для определения цитокинов мышей компании БИО-РАД (США) (GM-CSF, INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$ ) на приборе MAGPIX-100 (США). Установлено, что не зависимо от наличия или отсутствия генетических маркеров стафилококкового белка А в супернатантах изученных штаммов *S. aureus* выявлялись цитокино-подобные вещества. Таким образом, цитокиноподобная активность *S. aureus*, выявляемая с помощью мультиплексной тест-системы для определения цитокинов мышей, не зависит от наличия у бактерий гена *spa*, ответственного за продукцию стафилококкового белка А.

**Ключевые слова:** *S. aureus*, цитокины мышей, цитокиноподобные вещества, ген *spa*

DOI: 10.31857/S102872210007248-7

**Адрес:** Екатеринбург, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Зурочка Александр Владимирович.

Тел.: +79193077598. E-mail: av\_zurochka@mail.ru

**Авторы:**

**Зурочка А. В.**, д.м.н., профессор кафедры пищевых и биотехнологий, ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

**Зурочка В. А.**, д.м.н., профессор кафедры пищевых и биотехнологий, ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия; старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

**Фомина Л. О.**, аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии образования, Екатеринбург, Россия;

**Файзуллина А. И.**, аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии образования, Екатеринбург, Россия;

**Добрынина М. А.**, младший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

**Гриценко В. А.**, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Исследованиями, проведенными нами ранее, показано, что в супернатантах суточных культур бактерий разных видов с помощью тест-систем для мультиплексного анализа цитокинов человека (компании-производители: BioRAD и Multiplex) выявляются цитокино-подобные вещества (ЦПВ), аналогичные цитоки-

нам человека, в широком спектре и различных концентрациях [1, 2]. Среди изученных видов/родов микроорганизмов (стафилококки, энтерококки, эшерихии и др.) наиболее активными продуцентами ЦПВ являлись бактерии вида *Staphylococcus aureus*, причем часть штаммов (как музейных, так и клинических) выделяли в среду инкубации большое количество ЦПВ (до 21) и в относительно высоких концентрациях, тогда как другие изоляты либо их не секретировали, либо секретировали, но в незначительных количествах.

Нельзя исключить, что подобная активность может быть связана с продукцией в среду бактериями веществ, неспецифически взаимодействующих с антителами против цитокинов человека. Так, известно, что многие штаммы *S. aureus* способны секретировать в питательную среду белок А, обладающий способностью через Fc-фрагменты иммуноглобулинов связываться с IgG человека и животных. В этой связи логично предположить, что такая выраженная цитокиноподобная активность *S. aureus* могла быть связана с его продукцией. Однако стафилококковый белок А секретруется не всеми штаммами *S. aureus*, и его нет у коагулазоотрицательных стафилококков, для которых также была показана цитокиноподобная активность [3].

С другой стороны, в исследованиях зарубежных авторов было установлено, что в среде культивирования у отдельных клинических изолятов *S. aureus* обнаруживались какие-то продукты, которые при постановке ИФА давали перекрестную реакцию с антителами для мышинных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  [4]. Эта кросс-реакция, которая, по мнению авторов, связана с некоторыми неизвестными продуктами *S. aureus*, взаимодействующими с антителами против мышинных цитокинов, может приводить к получению ложноположительных и завышенных результатов при определении концентрации цитокинов в тестируемых жидкостях. Авторами так же предполагается, что такая кросс-реакция может быть связана с продукцией белка А стафилококков.

Указанные обстоятельства определяют повышенный интерес к вопросу, насколько связана цитокиноподобная активность *S. aureus* при взаимодействии их супернатантов с антицитокиновыми антителами в тест-системах для определения цитокинов мышей с наличием у них генетических детерминант (ген *spa*), ответственных за продукцию стафилококкового белка А. Важно

также совпадает ли такая активность с уже известными данными по определению ЦПВ у стафилококков при использовании тест-систем для определения цитокинов человека.

**Целью** настоящего исследования явилось сравнительное изучение цитокиноподобной активности у клинических и музейных штаммов *S. aureus*, оппозитных по генетическим маркерам стафилококкового белка А, с помощью тест-систем для мультиплексного иммунофлюоресцентного анализа цитокинов мыши.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Продукция ЦПВ была изучена у 6 штаммов *S. aureus*, в том числе 2 эталонных штамма из АТСС № 6538–209Р и АТСС № 25923 (ТМ2), имеющих генетические маркеры стафилококкового белка А (*spa*), 2 клинических изолята, у которых ген *spa* не выявлялся — *S. aureus* Г886 и *S. aureus* К33, а также 2 клинических штамма, несущих генетический маркер белка А — *S. aureus* К39 и *S. aureus* Г885.

Бактерии выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) в течение 24 ч при 37°С, после чего культуры центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 минут и препаративно отбирали фильтрат надосадочной жидкости (супернатант).

Наличие в супернатантах бактерий цитокиноподобных веществ (ЦПВ) определяли иммунофлюоресцентным методом на приборе MAGPIX-100 (США) с использованием 8-плексной тест-системы фирмы БИО-РАД (США) для определения цитокинов мышей (GM-CSF, INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$ ). Во всех случаях контролем служил МПБ без бактерий.

Наличие гена, ответственного за продукцию стафилококкового протеина А (*spa*), определяли путем постановки ПЦР с использованием многоканального амплификатора и подобранных праймеров [5, 6].

Выделение ДНК осуществляли из бактериальных взвесей (10<sup>8</sup> КОЕ/мл), приготовленных из суточных агаровых культур *S. aureus*, сорбционным методом с использованием набора реактивов «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия) согласно рекомендации производителя.

Обнаружение ген *spa*, ассоциированного с патогенностью *S. aureus* проводили с помощью постановки мультиплексной ПЦР с использованием подобранных праймеров: олигонуклеотидная последовательность (5'→3'), AGCACAAAAGA

GGAAGACAA → GTTTAACGACATGTACTCC  
GT размер продукта 200–400 п.н.

Для их подбора, а также оптимальных условий проведения анализа пользовались программой PrimerSelect из пакета программ Lasergene, в том числе – Megaline (Lasergene) (DNASTAR, Inc. США).

Аmplификацию проводили с использованием стандартных наборов на многоканальном амплификаторе «Терцик МС-2» («ДНК-технология», Россия) по следующему протоколу: 1 цикл – 94°C, 5 мин; 30 циклов: 94°C, 30 сек; 55°C, 30 сек; 72°C, 30 сек; последний цикл – 2 мин при 72°C. Продукты амплификации анализировали путем электрофоретического разделения в горизонтальном 1,7% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, в ТАЕ буферной системе с использованием стандартных наборов фирмы «ИнтерЛабСервис». В качестве маркеров использовали маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder (ЕвроГен). Положительное заключение о наличии гена делали при обнаружении в дорожке специфической светящейся полосы определенной массы, которую устанавливали по линейке молекулярных масс.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследования показали, что 4 штамма *S. aureus* (из 6 изученных) несли генетические детерминанты синтеза стафилококкового белка А, а 2 клинических изолята не имели гена *spa*. В то же время, данные, суммированные в **Таблице 1**, свидетельствуют о том, что через 24 часа культивирования бактерий в МПБ при 37°C в суперна-

тантах всех изученных штаммах *S. aureus* определялись различные цитокины при использовании тест-системы, предназначенной для определения цитокинов мыши. Более того концентрация определенных ЦПВ у изолятов, не несущих ген *spa*, была или идентична, или несколько выше чем у штаммов, имеющих генетические маркеры белка А. При этом надо отметить тот факт, что активность цитокиноподобной продукции всех изученных стафилококков была идентична и сравнима с использованием тест-систем для определения цитокинов человека. Важно так же отметить тот факт, что у стафилококков при использовании мультиплексной тест-системы для определения цитокинов мышей ЦПВ выявлялись не только IL-1β и TNF-α, а практически все изученные цитокины, что с одной стороны подтверждает данные других авторов [4], а с другой стороны возникает сразу несколько вопросов. Во-первых, ЦПВ определяемые в зависимости от антител к цитокинам сильно отличаются, так у всех штаммов INF-γ, IL-1β, IL-4, IL-10, TNF-α выявлялся в очень высоких концентрациях, на порядок превышающих уровень ЦПВ при определении GM-CSF, IL-2, IL-5. Во-вторых, этот процесс не зависел от наличия или отсутствия гена *spa*.

Все это выявляет один интересный факт о том, что детекция продукции ЦПВ стафилококков зависит в большей степени от типа моноклональных антител (к какому цитокину они получены), чем от типа тест-систем, применяемых для анализа (иммуоферментных, иммуофлюоресцентных, для определения цитокинов человека или мышей).

**Таблица 1.** Оценка продукции цитокино-подобных веществ штаммами *S. aureus*, оппозиционными по наличию гена *spa*, иммуофлюоресцентным методом по определению цитокинов мышей (пкг/мл)

Цитокины	<i>S. aureus</i> 209P (spa+)	<i>S. aureus</i> TM2 (spa+)	<i>S. aureus</i> Г 886 (spa-)	<i>S. aureus</i> К 33 (spa-)	<i>S. aureus</i> К 39 (spa+)	<i>S. aureus</i> Г 885 (spa+)
INFγ	590,0	612,0	485,0	722,0	685,0	301,0
IL-1β	503,0	528,0	398,0	756,0	623,0	327,0
IL-2	10,0	9,5	8,0	10,0	10,0	8,0
IL-4	607,0	648,5	567,5	698,0	702,0	482,0
IL-5	24,0	25,5	13,0	27,0	27,0	10,0
IL-10	301,0	332,0	233,0	418,0	424,0	179,5
TNF-α	354,0	382,0	215,0	440,0	434,0	185,5
GM-CSF	12,0	13,0	10,5	13,0	13,0	9,0

**Примечание:** (spa+) – есть ген белка А; (spa-) – ген белка А не выявлен.

Учитывая, что ранее были получены данные о том, что различными тест-системами, как для мультиплексного, так и для иммуноферментного анализов разных фирм производителей для определения цитокинов человека у стафилококков определялись ЦПВ [7], и выявление аналогичного эффекта при использовании тест-системы для определения цитокинов мышей, возникает вопрос о необходимости выделения этих веществ в чистом виде и их характеристике. Кроме того полученные нами данные свидетельствуют о том, что указанная активность напрямую не связана с наличием у бактерий генетических детерминант, ответственных за секрецию стафилококками белка А, и, по видимому, имеет другую природу.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном исследовании установлено, в супернатантах суточных бульонных культур *S. aureus*, оппозитных по наличию генетических маркеров продукции стафилококкового белка А, определяются «сходные» с цитокинами мышей ЦПВ в широком спектре и относительно высоких концентрациях. Немаловажным является факт штаммовой вариабельности цитокиноподобной активности бактерий: в изученной выборке изолятов *S. aureus* имелись штаммы бактерий как с относительно высоким уровнем продукции ЦПВ, так и с более низким и не зависела от наличия или отсутствия у них генетических детерминант (*spa*), ответственных за продукцию белка А, а в большей степени зависела от антител к тому или иному виду цитокина. Более того, штаммы, не несущие ген *spa*, секретировали в среду более высокие концентрации некоторых цитокинов по сравнению с оппозитными по данному генетическому маркеру штаммами, или секреция отдельных ЦПВ у них практически была идентичной.

В этой связи необходимо учитывать возможное получение ложно-положительных результатов в жидкостях и выделениях человека и животных при определении уровней в них цитокинов в условиях инфицирования биоматериала *S. aureus*. Это, например, относится к определению цитокинов в слюне, назальном секрете, в секретах кишечника, урогенитального тракта, в гнойном содержимом, при сепсисе (при септицемии и определении уровней цитокинов в крови). Следует также учитывать и уровень ЦПВ стафилококков, вызвавших воспалительный процесс.

### ВЫВОДЫ

1. В супернатантах суточных бульонных культур *S. aureus*, оппозитных по генетическим маркерам белка А стафилококков (*spa*), выявляются цитокиноподобные продукты их секреции в широком спектре и концентрациях при использовании тест-систем для определения цитокинов мышей.

2. Уровень секреции и спектр определяемых цитокиноподобных веществ, тестируемых мультиплексным анализом цитокинов мышей, не зависит от наличия у *S. aureus* генетических детерминант, ответственных за продукцию стафилококкового белка А.

Работа выполнена по теме из Плана НИР ИИФ УрО РАН, № гос. регистрации АААА-А18-118020690020-1, и теме из Плана НИР ИКВС УрО РАН, № гос. регистрации 116021510075.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Зурочка А. В., Дукардт В. В., Зурочка В. А., Добрынина М. А., Зуева Е. Б., Тяпаева Я. В., Гриценко В. А. Бактерии как продуценты цитокиноподобных веществ. Российский иммунологический журнал 2017, 11 (20), 3, 374–376. [Zurochka A. V., Dukardt V. V., Zurochka V. A., Dobrynina M. A., Zuyeva E. B., Tyapayeva Y. V., Gritsenko V. A. Bacteria as producers of cytokine-likesubstances. Russian journal of immunology 2017, 11 (20), 3, 374–376.]
2. Зурочка А. В., Зурочка В. А., Добрынина М. А., Зуева Е. Б., Тяпаева Я. В., Дукардт В. В., Гриценко В. А. Цитокиновая и антицитокиновая активность стафилококков. Методические особенности. Российский иммунологический журнал 2017, 11 (20), 4, 707–709. [Zurochka A. V., Zurochka V. A., Dobrynina M. A., Zuyeva E. B., Tyapayeva Y. V., Dukardt V. V., Gritsenko V. A. Cytokine and anticytokine activity of staphylococci. Methodical features. Russian journal of immunology. 2017, 11 (20), 4, 707–709.]
3. Зурочка А. В., Дукардт В. В., Зурочка В. А., Добрынина М. А., Зуева Е. Б., Тяпаева Я. В., Гриценко В. А. Стафилококки как продуценты цитокиноподобных веществ. Российский иммунологический журнал. 2017, 11 (20), 2, 134–136. [Zurochka A. V., Dukardt V. V., Zurochka V. A., Dobrynina M. A., Zuyeva E. B., Tyapayeva Y. V., Gritsenko V. A. Staphylococcus as producers of cytokine-likesubstances. Russian immunological magazine. 2017, 11 (20), 2, 134–136.]
4. Javed N., Xue G., Lu A., Xing Y., Iwakura Y., Xiao H., Lecoer H., Späth G. F., Meng G. Cross reactivity of *S. aureus* to murine cytokine assays: A source of discrepancy. Cytokine. 2016, 81, 101–108.
5. Гриценко В. А., Мавзютов А. Р., Пашкова Т. М., Карташова О. Л., Тяпаева Я. В., Белозерцева Ю. П. Генетический профиль *Staphylococcus aureus*, выделенных от бактерионосителей и больных с инфекционно-воспалительной патологией. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2018,

- 4, 56–62. [Gritsenko V.A., Mavzyutov A.R., Pashkova T.M., Kartashova O.L., Tyapayeva Ya.V., Belozertseva Yu.P. Genetics the *Staphylococcus aureus* profile, allocated from bacillicarriers and patients with infectious and inflammatory pathology. J. Microbiol., epidemiol. and immunobiol. 2018, 4, 56–62.]
6. Sabat A., Krzyszton-Russjan J., Strzalka W., Filipek R., Kosowska K., Hryniewicz W., Travis J., Potempa J. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. J. Clin. Microbiol. 2003. 41(4): 1801–1804.
7. Фомина Л. О., Файзуллина А. И., Зурочка В. А., Добрынина М. А., Симбирцев А. С., Гриценко В. А. Сравнительная оценка цитокиноподобной активности *Staphylococcus aureus* мультиплексным и иммуноферментным анализом. Российский иммунологический журнал. 2018, 12 (21), 3, 460–465. [Fomina L. O., Fayzullina A. I., Zurochka V. A., Dobrynina M. A., Symbircev A. S., Gritsenko V. A. Comparative evaluation cytokine-like activity of *Staphylococcus aureus* by methods multiplex and ELISA. Russian journal of immunology. 2018, 12 (21), 3, 460–465.]

## DETECTION OF CYTOKINE-LIKE SUBSTANCES WITH THE HELP OF A TEST SYSTEM FOR THE DETERMINATION OF CYTOKINES IN A MOUSE IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, OPPOSITE FOR *SPA* GENE

© 2019 A. V. Zurochka<sup>1,2\*</sup>, V. A. Zurochka<sup>1,2</sup>, L. O. Fomina<sup>1</sup>,  
A. I. Fayzullina<sup>1</sup>, M. A. Dobrynina<sup>1</sup>, V. A. Gritsenko<sup>3</sup>

\*E-mail: av\_zurochka@mail.ru

<sup>1</sup>Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg, Russia;

<sup>2</sup>South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russia;

<sup>3</sup>Orenburg Federal Research Center UrB RAS, Orenburg, Russia

**Received:** 18.05.2019. **Accepted:** 29.06.2019

In the work, cytokine-like activity was studied in 6 strains of *Staphylococcus aureus*, with and without genetic determinants of staphylococcal protein A (*spa* gene). The *spa* gene in *S. aureus* was determined by the polymerase chain reaction (PCR) method. The production of cytokine-like substances in the supernatants of *S. aureus* daily broth cultures was determined using an 8-plex immunofluorescence test system for the determination of mouse cytokines from BIO-RAD (USA) (GM-CSF, INF- $\gamma$ , IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$ ) on the device MAGPIX-100 (USA). It was established that, regardless of the presence or absence of genetic markers of staphylococcal protein A, cytokine-like substances were detected in the supernatants of the studied strains of *S. aureus*. Thus, the cytokine-like activity of *S. aureus*, detected using a multiplex mouse test cytokine test system, does not depend on the presence of the *spa* gene in bacteria, which is responsible for the production of staphylococcal protein A.

*Key words:* *S. aureus*, mouse cytokines, cytokine-like substances, *spa* gene

### Authors:

**Zurochka A. V.**, ✉ MD, professor of the Department of food and biotechnology, senior researcher of the laboratory of molecular immunology of the South Ural state University (national research University), Chelyabinsk, Russia; leader scientific researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

Yekaterinburg, Institute of immunology and physiology, Ural branch of the Russian Academy of Sciences. Phone: +79193077598, E-mail: av\_zurochka@mail.ru

**Zurochka V. A.**, MD, professor of the Department of food and biotechnology, senior researcher of the laboratory of molecular immunology of the South Ural state University (national research University), Chelyabinsk, Russia; senior scientific researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

**Fomina L. O.**, post-graduate student of the Institute of immunology and physiology of the Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

**Fayzullina A. I.**, post-graduate student of the Institute of immunology and physiology of the Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

**Dobrynina M. A.**, Junior scientific researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

**Gritsenko V. A.**, MD, Professor, Chief Researcher of Orenburg Federal Research Center UrB RAS, Orenburg, Russia.

## ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К PD-1 ЧЕЛОВЕКА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

© 2019 г. Е. Н. Исаева\*, С. А. Синева, Н. В. Пигарева,  
А. С. Симбирцев

\*E-mail: e.n.isaeva@hpb.spb.ru

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»  
ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 22.05.2019. Принята: 27.06.2019

Рецептор PD-1 относится к семейству CD28. Этот коингибирующий рецептор является одним из представителей системы «иммунологических контрольных точек», поэтому разработка методов, позволяющих оценить активность подобных препаратов, весьма актуальна для клинической медицины. В работе проведено получение моноклональных анти-PD-1 антител (АТ) человека и тестирование их функциональной активности методом проточной цитометрии. Показано, что данный метод эффективен для быстрого скрининга функциональной активности моноклональных АТ.

**Ключевые слова:** МНК, PD-1 антитела, лимфоциты, экспрессия CD3, проточная цитометрия

DOI: 10.31857/S102872210007249-8

**Адрес:** Санкт-Петербург, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Исаева Елена Николаевна.  
Тел.: +7 812 499-16-78, +7 921 779-71-57 (моб.)  
E-mail: e.n.isaeva@hpb.spb.ru

### Авторы:

**Исаева Е. Н.**, к.б.н., биолог, лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственного научно-исследовательского института особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Синева С. А.**, ведущий биолог, лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственного научно-исследовательского института особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Пигарева Н. В.**, к.б.н., ведущий биолог, лаборатория биохимии белка ФГУП «Государственного научно-исследовательского института особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Симбирцев А. С.**, д.м.н., проф., член-корр. РАН, научный руководитель, ФГУП «Государственного научно-исследовательского института особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

PD-1 (от англ. «Programmed cell death-1» или CD279) — трансмембранный белок I типа, принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулинов. Данный белок представлен на активированных Т- и В-лимфоцитах, НКТ-клетках, а также активированных клетках миелоидного ряда [1]. Блокада сигнальных путей PD-1 сопровождается

увеличением пролиферативной активности лимфоцитов мыши и человека в условиях *in vitro* [2,3]. Блокада PD-1 рецептора на лимфоцитах моноклональными антителами приводит к реактивации специфического противоопухолевого ответа. В настоящее время активно исследуются моноклональные антитела — блокаторы PD-1 рецептора в моно- и комбинированной терапии опухолей [4–5]. С учетом актуальности подобных препаратов для клинической медицины, нами была предпринята попытка разработать моноклональные антитела против PD-1 человека с последующим тестированием их функциональной активности методом проточной цитометрии.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Получение моноклональных антител к PD1.* Моноклональные антитела получали по стандартной методике Kohler G, Milstein C путем слияния клеток мышиной миеломы SP2/0 с лимфоцитами из брюшных и подколенных лимфоузлов мыши. Иммунизировали 50 мкг рекомбинантного белка к PD-1 рецептору человека, полученного на трансфицированных клетках CHO в полном адьюванте Фрейнда, через месяц бустировали в/в 10 мкг того же препарата, слия-

ние проводили на четвертый день по бустеру. Отбор позитивных линий проводили, используя метод прямого ИФА на полистирольных платах высокого связывания. После клонирования и наработки моноклональных антител (мАТ) в асцитной жидкости мышей антитела очищали методом высаливания сульфатом аммония (45% насыщения) и аффинной хроматографии на белке А. Оценивали способность мАТ связывать PD-1 из раствора и конкурировать с коммерческими антителами анти-PD-1 (Merk, США), которые после проведения диализа, конъюгировали с биотином общепринятым методом, с финальной концентрацией в 3 мг/мл, за связывание с антигеном. По результатам были выбраны для дальнейшего исследования 14 мАТ.

**Модель.** Мононуклеарные клетки гепаринизированной периферической крови (МНК) условно здоровых доноров выделяли общепринятым методом. Затем клетки стимулировали ФГА (Sigma, США) в концентрации 15 мкг/мл (оптимальная концентрация в тесте стимуляции РБТЛ) для повышения экспрессии PD-1 рецептора на лимфоцитах. МНК инкубировали с плотностью  $1,5-2,0 \times 10^6$ /мл, 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Hyclon, США) в среде RPMI 1640 с гентамицином 100 мг/л, (Биолот, Россия). Для проведения проточной цитометрии на каждую из проб брали по  $2 \times 10^5$  жизнеспособных активированных лимфоцитов, дважды отмытых избытком ФБР с 2% ЭТС.

**Проточная цитофлуориметрия.** В полученных после культивирования образцах определяли основные популяции лимфоцитов: Т-клетки выявляли как CD3<sup>+</sup>, Т-хелперы – как CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, а цитотоксические Т-лимфоциты – как CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Подготовку образцов для проведения цитофлуориметрического учета проводили в соответствии с рекомендациями, приведенными в работе Хайдукова и соавторов [7]. Для окрашивания клеток применялась следующая панель моноклональных антител: CD3-FITC/CD4-PE, CD3-FITC/CD8-PE и антитела против PD-1, конъюгированные с PC5.5, а также соответствующие им антитела изотипического контроля (все антитела производства Beckman Coulter, США) клеток.

Для оценки эффективных концентраций собственных препаратов анти-PD-1 антител к 50 мкл суспензии лимфоцитов в ФБР с 0,2% БСА (содержавшим  $4 \times 10^5$  лимфоцитов), добавляли 40 мкл тестируемых немеченых антител в следующих разведениях: (15, 1,5, 0,15 или 0,015 мкг/мл) и инкубировали 10 мин, затем вносили 10 мкл

биотинилированных PD-1 (Merk, США), инкубировали еще 20 мин, затем образцы отмывали избытком ФБР, полученный осадок ресуспендировали и вносили 10 мкл раствора стрептавидина, меченного фикоэритрином (12-4317-87, eBioscience, США) (в разведении 1:1000), после чего инкубировали еще 20 минут в темноте при комнатной температуре. В контрольные пробирки вносили ФБР с 0,25% БСА.

Все стадии подготовки образцов к цитометрическому учету осуществляли в полипропиленовых пробирках для цитометрии 12x75мм. После завершения инкубации образцы дважды отмывали избытком ФБР и анализировали на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter, США). Настройку цитофлуориметра осуществляли в соответствии с рекомендациями производителей антител.

Активность тестируемых образцов оценивали по средней интенсивности флуоресценции, учитывая 5000 событий. Процент ингибирования определяли по отношению средней интенсивности флуоресценции разведений немеченых образцов к стандартному образцу. Результаты повторяли не менее трех раз.

Статистическую обработку проводили с использованием программ Statistica. Определяли среднее арифметическое, ошибку среднего арифметического, достоверность различий определяли при помощи t-критерий Стьюдента (при объединении популяций лимфоцитов).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

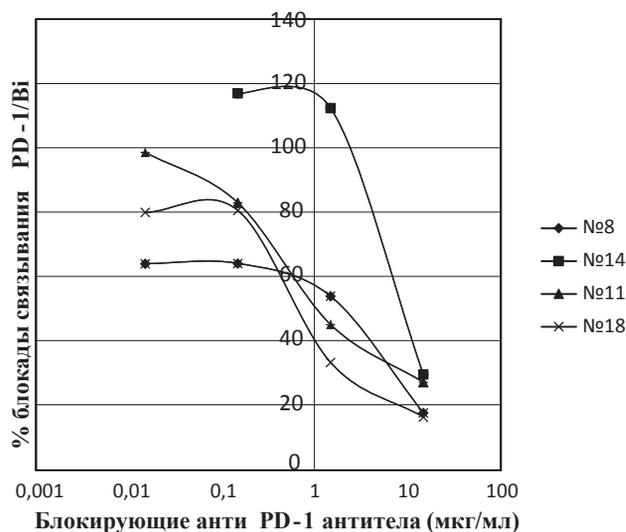
Свежевыделенные МНК представляют не самую удобную модель для тестирования анти-PD-1 моноклональных антител. Вместе с тем, экспрессия гена PD-1 на циркулирующих в периферической крови человека Т-лимфоцитах увеличивается после стимуляции anti-CD3 или anti-CD3/CD28 mAb [3]. Было показано, что уровень экспрессии белковой формы PD-1 повышался на Т-хелперах периферической крови примерно в четыре раза (с 10% до 40%) уже через сутки после внесения в среду для культивирования клеток РМА и иономицина [8]. В работе Saunders и соавторов было проведено сравнительное исследование уровня экспрессии PD-1 на CD3-позитивных лимфоцитах периферической крови человека после стимуляции anti-CD3 моноклональными антителами и ФГА стимуляции. Авторы показали, что только 15–18% нестимулированных CD3-позитивных лимфоцитов экспрессируют PD-1. Причем после стимуляции ФГА наблюдали максимально быстрое

и значительное увеличения процента клеток, экспрессирующих PD-1 (27–35% через 24 ч; 80–84% через 48 ч и более 90% через 72 и 96 ч). Проанализировав литературные данные, мы выбрали в качестве модели ФГА стимулированные лимфоциты периферической крови человека на 3–4 сутки активации.

Фенотипический анализ МНК, проведенный в работе выявил, что на 3 сутки 60,5 (4,8)% лимфоцитов были CD3-позитивны и 81,8 (5,15)% на 4 сутки. Содержание Т-хелперов на 3 сутки составляло 41,1 (0,52)% и 45,8 (0,95)% на 4 сутки. Т-супрессоры составляли 20,1 (1,31)% общей популяции на 3 сутки стимуляции и 31,2 (1,23)% на 4 сутки.

Анализ уровня экспрессии PD-1 рецептора на лимфоцитах периферической крови человека, как с помощью биотинилированных анти-PD-1 антител (цитофлуориметр Epics XL), так и антител против PD-1, конъюгированных с PC5.5 (проточный цитофлуориметр Navios), показал, что 60–80% клеток (в зависимости от донора) позитивны на 3 и 4 сутки стимуляции. Из представленных результатов видно, что практически все CD3 лимфоциты экспрессировали PD-1, что позволяло рассматривать разработанную нами систему в качестве оптимальной для проведения работ по тестированию препаратов антител, полученных против PD-1 человека. Полученные результаты соответствуют данным литературы [8, 9].

В ходе дальнейших экспериментов на описанной выше модели PD-1-позитивных лимфоцитов оценивали специфичность связывания и дозозависимый эффект немеченых функциональных антител. С применением молекулярно-биологических методов исследования было выделено 14 клонов, продуцирующих искомые антитела. Дальнейшее тестирование моноклональных антител проводили методом проточной цитофлуориметрии в тесте лимфопрлиферативной блокады. Тестировали серийные разведения немеченых образцов АТ в диапазоне (15–0,015 мкг/мл). РЕ сигнал оценивали на основании физического гейта всей популяции лимфоцитов. В результате анализа выявлено четыре образца немеченых антител, которые были способны дозозависимо блокировать связывание биотинилированных PD-1 антител с рецептором на лимфоцитах в диапазоне от 15 мкг/мл до 0,15 мкг/мл. Образцы № 11 и № 18 блокировали связывание с рецептором в диапазоне от 15 мкг/мл до 0,015 мкг/мл. Процент ингибирования связывания немеченых моноклональных



**Рисунок 1.** Оценка конкурентного связывания разных концентраций образцов (№ 8, 11, 14, 18) функциональных немеченых анти-PD-1 антител с постоянной концентрацией анти-PD-1/Вi антител (1,5 мкг/мл) с PD-1 рецептором на  $2 \times 10^5$  ФГА (15 мкг/мл) стимулированных МНК на 3 сутки, с последующим выявлением стретавидином, конъюгированным с РЕ. Оценка методом проточной цитофлуориметрии по среднеарифметической величине интенсивности флюоресценции. Усредненные данные трех повторных экспериментов.

PD-1 антител и анти PD-1/Вi антител с рецептором на лимфоцитах отражен на **Рисунке 1**.

## ВЫВОДЫ

1. Полученные моноклональные антитела связываются с PD-1 рецептором на лимфоцитах человека.
2. Использованная модель адекватна и перспективна для анализа активности и специфичности моноклональных антител против PD-1 рецептора.

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам отдела иммунологии ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины” к.б.н., с.н.с. Кудрявцеву И. В. и н.с. Серябряковой М. К. за консультации и техническую поддержку в выполнении работы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Freeman G. J., Long A. J., Iwai Y., Bourque K., Chernova T., Nishimura H., Fitz L. J., Malenkovich N., Okazaki T., Byrne M. C., Horton H. F., Fouser L., Carter L., Ling V., Bowman M. R., Carreno B. M., Collins M., Wood C. R., Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 2000, 192(7), 1027–1034.

2. Bennet F., Luxenberg D., Ling V., Wang L.-M., Marcquette K., Lowe D., Khan N. M., et al. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL21, but not CD28, IL-7 and IL-15 response. *J. Immunol.* 2003, 170, 711–718.
3. Боголюбова А. В., Ефимов Г. А., Друцкая М. С., Недоспасов С. А. Иммуноterapia опухолей, основанная на блокировке иммунологических контрольных «точек» («чекпойнтов»). *Медицинская иммунология* 2015, 17(5), 395–406. [Bogolyubova A. V., Efimov G. A., Drutskaya M. S., Nedospasov S. A. Immunotherapy of tumors based on blocking of immunological control “points” (“checkpoints”). *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya* 2015, 17(5), 395–406.]
4. Wang Yi., Wu L., Tian Ch., Zhang Y. PD-1/PD-L1 immune-checkpoint blockade in malignant lymphoma. *Ann Hematol.* 2018, (97), 229–237.
5. Топтыгина А. П. Коингибирующие молекулы в норме и при патологии. Контрольные точки (checkpoints) иммунорегуляции. Часть 2. Участие коингибирующих молекул в развитии инфекционной и онкологической патологии. Моноклональные антитела – блокаторы контрольных точек. *Российский иммунологический журнал* 2018, 12(1), 3–16. [Toptygina A. P. Co-inhibitory molecules in normal and in pathological conditions. Immunological checkpoints. Part 2. Participation of co-inhibitory molecules in the development of infectious and oncological diseases. Monoclonal antibodies – checkpoint blockers. *Russian Journal of Immunology* 2018, 12(1), 3–16.]
6. Хайдуков С. В., Байдун Л. А., Зурочка А. В., Тоголян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» (Проект). *Медицинская иммунология* 2012, 14(3), 255–268. [Khaydukov S. V., Baydun L. A., Zurochka A. V., Togliyan Areg A. Standardized technology «Study of peripheral blood lymphocyte subpopulation composition using flow cytometry analyzers» (Draft). *Medical Immunology (Russia)* 2012, 14(3), 255–268.]
7. Sim J. H., Park M. J., Park S., Lee E. S. Altered expression of costimulatory molecules in Behçet’s disease according to clinical activity. *Br. J. Dermatol.* 2011, 164(6), 1285–1291.
8. Saunders P. A., Hendrycks V. R., Lidinsky W. A. and Woods M. L. PD-L2: PD-L1 involvement in T cell proliferation, cytokine production, and integrin-mediated adhesion. *European Journal of Immunology* 2005, 35, 3561–3569.
9. Campbell D. E., Tustin N. B., Riedel E., Tustin III R., Taylor J., Murray J., and Douglas S. D. Cryopreservation decreases receptor PD-1 co-inhibitory expression on peripheral blood mononuclear cell-derived T cells and monocytes. *Clinical and Vaccine Immunology* 2009, 9, 1648–1653.

## MONOCLONAL ANTIBODY TO HUMAN PD-1 END DETERMINATION OF ITS SPECIFIC ACTIVITY BY FLOW CYTOMETRY

© 2019 E. N. Isaeva\*, S. A. Sineva, N. V. Pigareva, A. S. Simbirtsev

\*E-mail: e.n.isaeva@hpb.ru

*FGUP “State Research Institute of Highly Pure Biopreparations” Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russia*

**Received:** 22.05.2019. **Accepted:** 27.06.2019

The cell receptor PD-1 is a member of the CD28. This coinhibitory receptor is a member of subfamily “immunological checkpoints”. For this reason, testing the activities of such preparations is important for clinical medicine. In this study, a human monoclonal anti PD-1 antibody was developed and tested for functional activity by flow cytometry immunophenotyping analysis. This method was demonstrated to be effective for protein identification and for fast screening of monoclonal antibody functional activity.

*Key words:* mononuclear cells, PD-1 antibody, expression of CD3<sup>+</sup>, flow cytometry

### Authors:

**Isaeva E. N.**, ☒ candidat of biology, biologist laboratory of protein biochemistry FGUP “State Research Institute of Highly Pure Biopreparations” Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russia.

St. Petersburg. FGUP “State Research Institute of Highly Pure Biopreparations” Federal Agency for Medicine and Biology.

Phone: +78124991678, +79217797157(mob.), **E-mail:** e.n.isaeva@hpb.spb.ru;

**Sineva S. A.**, lead biologist, laboratory of protein biochemistry FGUP “State Research Institute of Highly Pure Biopreparations” Federal Agency for Medicine and Biolog, St. Petersburg, Russia;

**Pigareva N. V.**, candidat of biology, lead biologist, laboratory of protein biochemistry FGUP “State Research Institute of Highly Pure Biopreparations” Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russia;

**Simbirtsev A. S.**, MD, corresponding member of RAS, Professor, of scientific adviser of FSUE “ State. Research Institute “ FMBA of Russia, St. Petersburg, Russia.

## СРАВНЕНИЕ РАННЕГО ИММУННОГО ОТВЕТА МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ТУЛЯРЕМИЙНЫМ ВАКЦИННЫМ ШТАММОМ И ЕГО ПРОИЗВОДНЫМИ

© 2019 г. А. С. Карцева\*, М. В. Силкина, О. В. Калмантаева, Р. И. Миронова, В. В. Фирстова, В. М. Павлов, И. Г. Шемякин

\*E-mail: kartseva\_as@mail.ru

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»  
Роспотребнадзора, Оболенск, Россия

Поступила: 22.05.2019. Принята: 27.06.2019

В работе приведены сравнительные данные специфического иммунного ответа у мышей после их иммунизации бактериями *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными *F. tularensis* SRI-1 или *F. tularensis* 15/23–1ΔrecA. Штамм *F. tularensis* SRI-1 обеспечивал 100% защиту мышей от подкожного заражения высоковирулентным штаммом *F. tularensis* Schu в дозе 3000 КОЕ/мышь. На 30 сутки иммуногенеза уровень титров антител к ЛПС *F. tularensis* во всех группах иммунизированных животных был практически одинаков. В ранние сроки иммуногенеза выявлены повышенная активация В-лимфоцитов и цитотоксических лимфоцитов в крови и увеличенное содержание активированных цитотоксических лимфоцитов в селезенке у мышей, иммунизированных *F. tularensis* SRI-1, в отличие от двух других иммунных групп животных.

**Ключевые слова:** *Francisella tularensis*, вакцина, цитометрия, лимфоциты, протективный иммунитет

DOI: 10.31857/S102872210007250-0

**Адрес:** Оболенск, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Карцева Алена Сергеевна. Тел.: +74967312084.

**E-mail:** kartseva\_as@mail.ru

**Авторы:**

**Карцева А. С.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Силкина М. В.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Калмантаева О. В.**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Миронова Р. И.**, научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Фирстова В. В.**, д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Павлов В. М.**, д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории микробиологии туляремии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Шемякин И. Г.**, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Туляремия представляет собой зоонозное природно-очаговое инфекционное заболевание, вызываемое внутриклеточной бактерией *Francisella tularensis*. Вакцинопрофилактику туляремии на территории России проводят вакциной туляремиальной живой сухой, созданной на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ [1]. В странах Западной Европы и Северной Америки вакцинопрофилактику проводят по показаниям только среди военнослужащих, используя живую вакцину, содержащую штамм *F. tularensis* LVS (Live Vaccine Strain), полученный в результате многочисленных пассажей *F. tularensis* 15 *in vitro* [2, 3]. Существующие аттенуированные вакцинные штаммы формируют длительный иммунитет против туляремии (5 лет), но характеризуются умеренной реактогенностью и генетической нестабильностью [4, 5]. Кроме

того, вакцинные штаммы *F. tularensis* 15 НИИЭГ и LVS не формируют протективный иммунитет против аэрозольного заражения вирулентными штаммами *F. tularensis* subsp. *tularensis*, что показано на многих биологических моделях [6, 7, 8]. Поэтому разработка безопасной и протективной туляреминой вакцины является актуальным вопросом.

Многолетние исследования возбудителя туляремии позволили охарактеризовать метаболизм бактерий, выяснить механизмы их внутриклеточного размножения и реакции иммунной системы на патоген [9, 10]. Генетические методы направленной модификации генома *F. tularensis* и полногеномное секвенирование подвидов туляреминого микроба позволило получить новые вакцинные штаммы [11]. В нашем научном Центре было создано 2 штамма-кандидата в вакцинные: *F. tularensis* SRI-1 (с инактивированными генами *iglC* (одной копией) и *recA*, а также модификацией гена *sodB*) и *F. tularensis* 15/23–1ΔrecA (с инактивированными генами *iglC* (одной копией) и *recA*). Полученные штаммы характеризуются снижением реактогенности по сравнению с исходным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ [12, 13].

Уровень протективности иммунитета определяется в ранние сроки после вакцинации, когда происходит активация отдельных субпопуляций иммунокомпетентных клеток (ИКК), запускается синтез цитокинов и регулируется пролиферативная активность лимфоцитов.

**Цель исследования** – сравнить ранний иммунный ответ лимфоцитов мышей после иммунизации *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными: *F. tularensis* SRI-1 и *F. tularensis* 15/23–1ΔrecA.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на базе Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора (рп Оболенск).

Мышей BALB/c (ФИБХ Питомник «Пушино», МО, г. Пушино) – по 10 особей в группе – иммунизировали однократно, подкожно в дозе  $10^2$  КОЕ/мл вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *F. tularensis* SRI-1 или *F. tularensis* 15/23–1ΔrecA («ГКПМ-Оболенск»). В качестве контроля выступала группа интактных мышей.

На 3 сутки после иммунизации по 5 животных каждой группы эвтаназировали, получали кровь и селезенки, откуда выделяли лимфоциты на градиенте плотности Histopaque-1,077

(Sigma, США). Субпопуляционный состав лимфоцитов определяли с использованием следующих комбинаций моноклональных антител: активированные цитотоксические Т-лимфоциты и Т-хелперы – CD45 APC-су7, CD3 FITC, CD4 APC, CD69 PE, CD25 PerCP-су5.5, CD30 PE, CD28 PerCP-су5.5; активированные В-лимфоциты – CD19 APC, CD69 FITC, CD25 PerCP-су5.5, CD30 PE, CD86 PE (все производства eBioscience, США). Цитометрические исследования проводили на проточном цитофлюориметре FACSAria III (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva (версия 8.0).

Для определения протективной активности вакцинных штаммов животным на 30 сутки после их иммунизации подкожно вводили в дозе 1000 LD<sub>50</sub> (3000 КОЕ) тест-заражающий штамм *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu. Наблюдение за животными вели в течение 21-х суток.

Перед заражением у животных получали сыворотку крови для определения антител к липополисахариду (ЛПС) *F. tularensis* 15 НИИЭГ методом иммуноферментного анализа согласно руководству [14]. Учет результатов проводили на приборе Thermo Scientific Varioskan Flash (Thermo Scientific, США).

**Статистика.** Систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2013. Данные по титрам антител выражали при помощи среднеарифметического значения группы и его стандартного отклонения. Результаты цитометрических данных описывались при помощи среднеарифметического значения (M) и стандартной ошибки среднего (m). Достоверность отличий определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни (при  $p < 0,05$ ) для независимых совокупностей [15] с помощью программы IBM SPSS Statistics версии 23.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

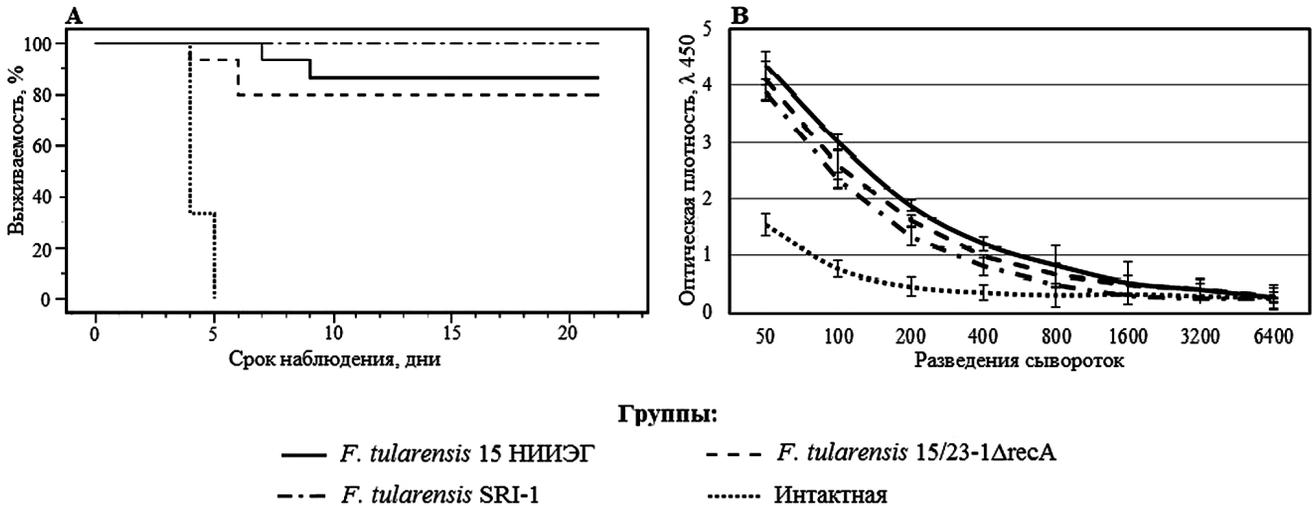
Мыши, иммунизированные *F. tularensis* SRI-1, были полностью защищены от заражения высоковирулентным штаммом *F. tularensis* Schu (**Рис. 1А**). Животные, иммунизированные *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/23–1ΔrecA, выживали в 86,7% и 80% случаев, соответственно. Все мыши интактной группы погибли к 5-м суткам после заражения *F. tularensis* Schu.

На 30 сутки после иммунизации во всех группах иммунизированных животных в сыворотке

**Таблица 1.** Изменение субпопуляционного состава лимфоцитов, полученных из крови и селезенки мышей линии BALB/c, после иммунизации штаммами *F. tularensis* (M±m).

Субпопуляции лимфоцитов	Группы мышей*				p**
	<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	<i>F. tularensis</i> SRI-1	<i>F. tularensis</i> 15/23-1 Δ recA	Контроль	
Показатели крови, %					
CD19 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	<b>7,56±0,60</b>	<b>7,74±0,53</b>	4,56±0,39	3,06±0,9	p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05
CD19 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	<b>8,4±0,86</b>	5,02±0,23	5±0,15	4,96±0,09	p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05
CD19 <sup>+</sup> CD30 <sup>+</sup>	3,68±0,30	<b>7,36±0,59</b>	3,62±0,59	3,11±0,07	p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05
CD19 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup>	8,2±0,70	7,69±0,65	4,34±0,41	3,94±0,1	p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	3,39±0,18	3,87±0,14	4,19±0,16	4,23±0,06	
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	3,88±0,12	3,72±0,18	3,6±0,17	3,16±0,06	
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD30 <sup>+</sup>	<b>6,32±0,44</b>	5,27±0,49	2,9±0,13	2,98±0,64	p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	4,19±0,28	3,73±0,22	3,34±0,89	3,31±0,08	
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	3,2±0,14	<b>7,24±0,62</b>	5,54±0,67	3,34±0,76	p <sub>1</sub> <0,05
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	3,87±0,26	<b>7,12±0,48</b>	<b>6,73±0,51</b>	3,18±0,07	p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD30 <sup>+</sup>	<b>7,08±0,29</b>	3,57±0,15	3,22±0,1	3,12±0,59	p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	3,38±0,51	2,96±0,10	3,98±0,19	3,19±0,08	
Показатели спленоцитов, %					
CD19 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	<b>5,95±0,57</b>	<b>6,25±0,45</b>	2,94±0,24	2,98±0,64	p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05
CD19 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	3,14±0,1	3,54±0,11	3,28±0,15	3,21±0,44	
CD19 <sup>+</sup> CD30 <sup>+</sup>	5,05±0,86	5,55±1,18	3,66±0,39	3,24±0,66	
CD19 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup>	<b>13,74±1,01</b>	<b>12,41±0,97</b>	6,77±1,27	5,06±0,07	
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	<b>9,2±0,82</b>	<b>10,5±0,71</b>	6,0±0,18	5,85±0,07	p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	5,04±0,16	4,5±0,24	4,09±0,18	4,4±0,06	p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD30 <sup>+</sup>	4,2±0,7	5,0±0,36	3,8±0,42	3,5±0,02	
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	<b>8,4±0,89</b>	4,34±0,47	3,37±0,17	3,18±0,05	p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	7,57±0,86	<b>12,7±1,18</b>	5,54±0,53	5,42±0,13	p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	3,73±0,2	4,41±0,26	3,29±0,19	3,32±0,07	
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD30 <sup>+</sup>	3,85±0,2	4,52±0,41	4,48±0,26	3,3±0,08	
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	3,93±0,21	<b>9,62±0,01</b>	4,16±0,34	3,94±0,76	p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05

**Примечания:** \* – Показанные результаты являются данными трех независимых экспериментов, каждый с использованием 5-ти отдельных животных в группе. \*\* – достоверность отличий по U-критерию Манна-Уитни между группами мышей, иммунизированных: p<sub>1</sub><0,05 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* SRI-1; p<sub>2</sub><0,05 – *F. tularensis* SRI-1 и *F. tularensis* 15/23–1ΔrecA; p<sub>3</sub><0,05 – *F. tularensis* 15/23–1ΔrecA и *F. tularensis* 15 НИИЭГ.



**Рисунок 1.** Выживаемость мышей после заражения бактериями *F. tularensis* Schu в дозе 1000 LD<sub>50</sub> (3000 КОЕ) (А) и титры IgG антител к ЛПС *F. tularensis* 15 в крови животных до заражения (В).

был выявлен сопоставимый уровень антител к ЛПС *F. tularensis* (Рис. 1В).

Во всех группах иммунизированных животных наблюдалось количественное и качественное изменение субпопуляций Т- и В-лимфоцитов по сравнению с интактной группой (Таблица 1).

Сравнительный анализ субпопуляций Т-лимфоцитов показал, что на 3 сутки после иммунизации штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ у мышей происходила активация Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), о чем свидетельствовало усиление экспрессии CD69 рецептора на их поверхности в селезенке, и CD30 молекулы – в крови. В группе мышей, иммунизированных *F. tularensis* SRI-1 наблюдалась активация как Т-хелперов, так и цитотоксических Т-лимфоцитов. А у мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15/23–1ΔrecA на 3 сутки иммуногенеза не наблюдалось достоверного увеличения процента CD69<sup>+</sup> или CD30<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. В этой группе мышей было выявлено только увеличение CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> субпопуляции в крови. Уровень экспрессии ко-рецепторной CD28 молекулы увеличивался на Т-хелперах в группе мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ, и на поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов, после иммунизации *F. tularensis* SRI-1.

Анализ субпопуляции В-лимфоцитов показал достоверное увеличение CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> клеток в селезенке и крови мышей, вакцинированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* SRI-1. Было отмечено достоверное увеличение коли-

чества CD19<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клеток в крови мышей, вакцинированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ. В группе мышей, иммунизированных *F. tularensis* SRI-1, в крови наблюдали увеличение CD19<sup>+</sup>CD30<sup>+</sup> субпопуляции. Уровень экспрессии ко-стимулирующей молекулы CD86 достоверно увеличивался на поверхности В-лимфоцитов, выделенных из селезенки и крови, вакцинированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* SRI-1. На 3-и сутки после иммунизации мышей *F. tularensis* 15/23–1ΔrecA в популяции В-лимфоцитов изменения уровня экспрессии анализируемых молекул выявлено не было.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты наших экспериментов показали, что после иммунизации мышей вакцинным штаммом и его производными, в крови животных появлялись антитела к ЛПС *F. tularensis* и их уровень достоверно не различался между группами. Тем не менее в экспериментах по заражению иммунных мышей высоковирулентным штаммом *F. tularensis* Schu были получены разные уровни выживаемости. Полученные результаты не противоречат литературным данным, свидетельствующим об отсутствии корреляции уровня антител к ЛПС *F. tularensis* с протективной защитой животных от заражения [16, 17].

На моделях мышей и крыс было показано, что защитная способность антител зависит от функциональной активности Т-лимфоцитов [15, 18, 19]. Следовательно, защита, наблюдаемая в этих моделях, свидетельствует о важной

регулирующей роли Т-клеточного звена в формировании протективного иммунитета.

Известно, что в первые 3-е суток после первичного проникновения бактерий формируются реакции врожденного иммунитета, а затем запускаются реакции адаптивного иммунитета. В связи с этим мы оценили уровень активации Т- и В-лимфоцитов в крови и селезенке мышей на 3-и сутки после их иммунизации разными штаммами бактерий *F. tularensis*.

Ранним маркером активации клеток является CD69 рецептор, который играет важную регулируемую роль в переключении неспецифических реакций ИКК на адаптивные, участвует в регуляции эффекторной активности лимфоцитов, а также CD69 рецептор отражает презентующую активность антигенпрезентирующих клеток (АПК) [20]. Результаты наших экспериментов показали, что на 3-и сутки после вакцинации штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* SRI-1 у мышей в крови и селезенке увеличивалось количество CD69<sup>+</sup> В-лимфоцитов, что позволяет предположить об их активном включении в формирование специфических реакций. В этих же группах мышей увеличивалось количество В-клеток, экспрессирующих CD86 рецептор, что отражает усиление межклеточных взаимодействий. Об усилении межклеточных взаимодействий свидетельствует также повышение уровня CD28 молекулы при иммунизации *F. tularensis* 15 НИИЭГ на поверхности CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, а в группе мышей *F. tularensis* SRI-1 — на поверхности CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток. CD28 рецептор, который связывается с CD80 и/или CD86 рецепторами на АПК, является классической костимулирующей молекулой, участвующей в обеспечении нормального иммунного ответа. Отсутствие межрецепторных взаимодействий с CD28 рецептором приводит к формированию лимфоцитарной толерантности [21].

В группе мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ, отмечали усиление экспрессии CD25 рецептора на поверхности В-лимфоцитов. Как известно, лигандом CD25 рецептора является ИЛ-2 при связывании которого происходит усиление пролиферативной активности лимфоцитов. По всей видимости, бактерии *F. tularensis* 15 НИИЭГ инициируют пролиферативную активность лимфоцитов раньше остальных штаммов сравнения. В группе мышей, иммунизированных *F. tularensis* SRI-1 наблюдали повышение экспрессии CD30 рецептора на поверхности В-лимфоцитов, что, вероятно, отражает усиление эффекторной активности клеток, т.к.

появление CD30 молекулы коррелирует с активным синтезом этой клеткой ИЛ-17А [22].

Т-лимфоциты также являются ключевыми медиаторами протективного туляремиального иммунитета [17, 23]. При туляремиальной инфекции важную роль играют и цитотоксические лимфоциты и Т-хелперы. Об этом свидетельствует снижение протективного иммунитета у мышей BALB/c и C57Bl/6 при истощении CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клеток у иммунных животных до заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* [24]. Результаты наших исследований показали, что после вакцинации *F. tularensis* SRI-1 увеличивалось количество CD69<sup>+</sup>-позитивных клеток в субпопуляциях Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов, а также CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клеток. После вакцинации *F. tularensis* 15 НИИЭГ в селезенке мышей достоверно увеличивалось количество только CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> клеток и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD30<sup>+</sup> клеток. В группе мышей, вакцинированных *F. tularensis* 15/23—1ΔrecA, увеличивалось только содержание CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клеток в крови.

## ВЫВОДЫ

1. Штамм *F. tularensis* SRI-1 — кандидат в вакцинные — отличается от штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/23—1ΔrecA 100% защитой мышей от подкожного заражения высоковирулентным штаммом *F. tularensis* Schu в дозе 3000 КОЕ/мышь.

2. На 30 сутки иммуногенеза уровень титров антител к ЛПС *F. tularensis* практически не отличается между группами мышей, иммунизированных *F. tularensis* SRI-1, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/23—1ΔrecA.

3. В ранние сроки иммуногенеза выявлены повышенная активация В-лимфоцитов и цитотоксических лимфоцитов в крови у мышей, иммунизированных *F. tularensis* SRI-1, в отличие от двух других иммунных групп животных.

4. В селезенке в ранние сроки иммуногенеза выявлено увеличенное содержание активированных цитотоксических лимфоцитов у мышей, иммунизированных *F. tularensis* SRI-1, в отличие от других иммунизированных групп животных.

Работа выполнена в рамках Отраслевой программы Роспотребнадзора.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Олсуфьев Н. Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. «Медицина», Москва, 1975, 192. [Olsufev N. G. Tax-

- onomy, microbiology and laboratory diagnosis of the causative agent of tularemia. "Medicina", Moscow, 1975, 192.]
2. Petra C. F. Oyston. *Francisella tularensis* vaccines. Vaccine 2009, 27 (D48–D51).
  3. Griffin K. F., P.C.F. Oyston, R. W. Titball. *Francisella tularensis* vaccines. FEMS Immunology & Medical Microbiology 2007, 49(3), 315–323.
  4. Conlan J. W., Shen H., Golovliov I., Zingmark C., Oyston P. C., Chen W., House R. V., Sjöstedt A. Differential ability of novel attenuated targeted deletion mutants of *Francisella tularensis* subspecies tularensis strain SCHU S4 to protect mice against aerosol challenge with virulent bacteria: effects of host background and route of immunization. Vaccine 2009, 28(7), 1824–1831.
  5. Медуницын Н. В. Вакцинология. «Триада-Х», Москва, 1999, 272. [Medunitsyn N. V. Vaccinology. «Triada-X», Moscow, 1999, 272.]
  6. Conlan J. W., Shen H., KuoLee R., Zhao X., Chen W. Aerosol-, but not intradermal-immunization with the live vaccine strain of *Francisella tularensis* protects mice against subsequent aerosol challenge with a highly virulent type A strain of the pathogen by an  $\alpha\beta$  T cell- and interferon gamma- dependent mechanism. Vaccine 2005, 23, 2477–2485.
  7. Jia Q., Horwitz M. A. Live attenuated tularemia vaccines for protection against respiratory challenge with virulent *F. tularensis* subsp. tularensis. Frontiers in cellular and infection microbiology 2018, 8, 154.
  8. Ray H. J., Cong Y., Murthy A. K., Selby D. M., Klose K. E., Barker J. R., Guentzel M. N., Arulanandam B. P. Oral Live Vaccine Strain-Induced protective immunity against pulmonary *Francisella tularensis* challenge is mediated by CD4<sup>+</sup> T Cells and antibodies, including Immunoglobulin A. Clin. Vaccine Immunol 2009, 16, 444–452.
  9. Celli J., Zahrt T. C. Mechanisms of *Francisella tularensis* intracellular pathogenesis. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2013, 3(4), a010314.
  10. Roberts L. M., Powell D. A., Frelinger J. A. Adaptive Immunity to *Francisella tularensis* and Considerations for Vaccine Development. Frontiers in cellular and infection microbiology 2018, 8, 115.
  11. Bakshi C. S., Malik M., Mahawar M., Kirimanjswara G. S., Hazlett K. R., Palmer L. E., Furie M. B., Singh R., Melendez J. A., Sellati T. J., Metzger D. W. An improved vaccine for prevention of respiratory tularemia caused by *Francisella tularensis* SchuS4 strain. Vaccine 2008, 26(41), 5276–5288.
  12. Мокриевич А. Н. Молекулярно-генетические подходы к исследованию возбудителя туляремии для целей совершенствования диагностики и специфической профилактики. автореферат дис. ... доктора медицинских наук/Моск. науч. – исслед. ин-т эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского МЗ РФ. Оболенск, 2016. [Mokrievich A. N. Molecular genetic approaches to the study of the causative agent of tularemia for the purpose of improving diagnostics and specific prevention. Abstract dis... Doctors of Medical Sciences/Moscow Institute of Epidemiology and Microbiology. G. N. Gabrievskogo Ministry of Health of the Russian Federation. Obolensk, 2016.]
  13. Сотникова М. А., Кравченко Т. Б., Бахтеева И. В., Миронова Р. И., Комбарова Т. И., Мокриевич А. Н., Павлов В. М. Биологические свойства штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ со сниженной экспрессией гена *sodB*, кодирующего железозависимую супероксиддисмутазу. Эпидемиология и вакцинопрофилактика 2016, 15, 5(90), 24–29. [Sotnikova M. A., Kravchenko T. B., Bakhteeva I. V., Mironova R. I., Kombarova T. I., Mokrievich A. N., Pavlov V. M. The Biological Properties of the Strain *Francisella tularensis* 15 NIEG with Decreased Gene Expression *sodB*, Encoding Fe-Dependent Superoxide Dismutase. Epidemiology and Vaccinal Prevention 2016, 15, 5(90), 24–29.]
  14. Ngo T. T., Lenhoff H. M. Enzyme-mediated immunoassay. «Plenum Press», New York and London, 1988, 444.
  15. Гланц С. Медико-биологическая статистика. «Практика», Москва 1999, 459. [Glantz S. Biomedical statistics. «Praktika», Moscow 1999, 459.]
  16. Kirimanjswara G. S., Golden J. M., Bakshi C. S., Metzger D. W. Prophylactic and therapeutic use of antibodies for protection against respiratory infection with *Francisella tularensis*. Journal of immunology 2007, 179(1), 532–539.
  17. Sanapala S., Yu J. J., Murthy A. K., Li W., Guentzel M. N., Chambers J. P., Klose K. E., Arulanandam B. P. Perforin- and granzyme-mediated cytotoxic effector functions are essential for protection against *Francisella tularensis* following vaccination by the defined *F. tularensis* subsp. novicida  $\Delta$ fopC vaccine strain. Infection and Immunity, 2012, 80(6), 2177–2185.
  18. Волох О. А., Шенелев И. А., Фирстова В. В., Храмова Е. М., Авдеева Н. Г., Самохвалова Ю. И., Еремин С. А., Дятлов И. А., Жемчугов В. Е. Оценка иммунобиологической активности препаратов С-комплекса возбудителя туляремии как перспективного компонента химических вакцин. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2007, 3, 16–21. [Volokh O. A., Shepelev I. A., Firsova V. V., Khramkova E. M., Avdeeva N. G., Samokhvalova Yu. I., Eremin S. A., Dyatlov I. A., Zhemchugov V. Y. Evaluation of the immunobiological activity of C-complex agents of tularemia pathogen as a promising component of chemical vaccines. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology 2007, 3, 16–21.]
  19. Mara-Koosham G., Hutt J. A., Lyons C. R., Wu T. H. Antibodies contribute to effective vaccination against respiratory infection by type A *Francisella tularensis* strains. Infection and Immunity 2011, 79(4), 1770–1778.
  20. Vega-Ramos J., Alari-Pahissa E., Valle J. D., Carrasco-Marin E., Esplugues E., Borràs M., Martínez-A C., Lauzurica P. CD69 limits early inflammatory diseases associated with immune response to *Listeria monocytogenes* infection. Immunology Cell Biol 2010, 88(7), 707–715.
  21. Marin N. D., García L. F. The role of CD30 and CD153 (CD30L) in the anti-mycobacterial immune response. Tuberculosis 2016, 102, 8–15.
  22. Guo Y., Sun X., Shibata K., Yamada H., Muta H., Podack E. R., Yoshikai Y. CD30 is required for activation of a unique subset of interleukin-17A-producing  $\gamma\delta$  T cells in innate immunity against *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin infection. Infect Immun. 2013, 81(10), 3923–3934.

23. Roberts L. M., Crane D. D., Wehrly T. D., Fletcher J. R., Jones B. D., Bosio C. M. Inclusion of epitopes that expand high avidity CD4<sup>+</sup> T cells transforms sub-protective vaccines to efficacious immunogens against virulent *Francisella tularensis*. Journal of immunology 2016, 197(7), 2738–2747.
24. Barrigan L. M., Tuladhar S., Brunton J. C., Woolard M. D., Chen C. J., Saini D., Frothingham R., Sempowski G. D., Kawula T. H., Frelinger J. A. Infection with *Francisella tularensis* LVS clpB leads to an altered yet protective immune response. Infection and immunity 2013, 81(6), 2028–2042.

## COMPARISON OF THE EARLY IMMUNE RESPONSE OF MICE IMMUNIZED BY TULAREMIA VACCINE STRAIN AND ITS DERIVATIVES

© 2019 A. S. Kartseva\*, M. V. Silkina, O. V. Kalmantaeva, R. I. Mironova, V. V. Firstova, V. M. Pavlov, I. G. Shemyakin

\*E-mail: kartseva\_as@mail.ru

Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia

Received: 22.05.2019. Accepted: 27.06.2019

The paper presents comparative data of a specific mice immune response to immunization with *F. tularensis* 15 NIEG and its derivatives: *F. tularensis* SRI-1 or *F. tularensis* 15/23–1ΔrecA. The results of our experiments showed that after immunization of mice with a vaccine strain and its derivatives, antibodies to *F. tularensis* LPS appeared in the blood of animals and their level did not significantly differ between groups. Protection levels of these groups of immune mice against challenge with the highly virulent strain of *F. tularensis* Schu were different. A comparative analysis showed different expression levels of activation markers and co-stimulating molecules were observed on the surface of B and T lymphocytes on day 3 after mice immunization with different strains.

*Key words:* *Francisella tularensis*, vaccine, flow cytometry, lymphocytes, protective immunity

### Authors:

**Kartseva A. S.**, ✉ junior researcher, Laboratory of molecular biology, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia;

Obolensk, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare. Phone: +74967312084, E-mail: kartseva\_as@mail.ru;

**Silkina M. V.**, junior researcher, Laboratory of molecular biology, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia;

**Kalmantaeva O. V.**, Ph.D., researcher, Laboratory of molecular biology, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia;

**Mironova R. I.**, researcher, Laboratory of Anthrax microbiology, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia;

**Firstova V. V.**, Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher of the Laboratory of molecular biology, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia;

**Pavlov V. M.**, Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher of the Microbiology laboratory of Tularemia, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia;

**Shemyakin I. G.**, Doctor of Biological Sciences, professor, deputy director for Research, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia.

## ИЗМЕНЕНИЯ В СУБПОПУЛЯЦИОННОМ СОСТАВЕ «ПОЛЯРИЗОВАННЫХ» Т-ХЕЛПЕРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ

© 2019 г. И. В. Кудрявцев<sup>1,2\*</sup>, А. Г. Ильвес<sup>3</sup>, А. В. Ильченко<sup>1</sup>,  
И. И. Кробинец<sup>4</sup>, О. М. Новоселова<sup>3</sup>, К. С. Рубаник<sup>3</sup>,  
М. К. Серебрякова<sup>1</sup>, Л. Н. Прахова<sup>3</sup>

\*E-mail: igorek1981@yandex.ru

<sup>1</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Петрова»,  
Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup>ФГБНУ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>4</sup>ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА  
России», Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 22.05.2019. Принята: 27.06.2019

Рассеянный склероз (РС) относится к иммунологически опосредованным заболеваниям нервной системы, характеризующимся формированием очагов демиелинизации, в составе которых накапливаются лимфоциты. Целью исследования был анализ субпопуляционного состава «поляризованных» Т-хелперов (Th) периферической крови у пациентов с РС (n=38) с низкой длительностью заболевания – 1 год (8 мес; 1,5 года) и низким уровнем инвалидизации (EDSS – 1,0 (1,0; 1,5) баллов). В группу сравнения были включены 48 условно здоровых доноров, которые достоверно не отличались от больных РС по своему половому и возрастному составу. Было показано, что в рамках CD45RA<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> при РС достоверно снижается доля Th1 лимфоцитов, тогда как уровни циркулирующих Th17 и фолликулярных Th достоверно превосходят значения контроля. Анализ коэкспрессии хемокиновых рецепторов CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup> Th у больных РС выявил достоверное снижение доли Th1 клеток и увеличение содержания Tfh клеток. Также нами были выявлены существенные изменения субпопуляционного состава «поляризованных» CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> Th клеток при РС, связанные со снижением уровня Th1 и увеличением долей Th17 и фолликулярных Th. По-видимому, Th17 в составе нервной ткани отвечают за инфильтрацию нейтрофилами последней, тогда как Tfh могут принимать активное участие в формировании ответа, опосредованного В-лимфоцитами, в непосредственной близости от очага поражения, что может сопровождаться синтезом аутоантител и усилением активности нейтрофилов.

**Ключевые слова:** рассеянный склероз, проточная цитометрия, хемокиновые рецепторы, фолликулярные Т-хелперы, Т-хелперы 17

DOI: 10.31857/S102872210007251-1

**Адрес:** 197376, Санкт-Петербург, ул.акад. Павлова, 12, отдел иммунологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Кудрявцеву И. В. Тел.: +7 812 234-16-69.

**E-mail:** igorek1981@yandex.ru

**Авторы:**

**Кудрявцев И. В.**, к.б.н., с.н.с. отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия; с.н.с. отдела онкоиммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Петрова», Санкт-Петербург, Россия;

**Ильвес А. Г.**, к.м.н., с.н.с. лаборатории нейробиологии ФГБНУ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия;

**Ильченко А. В.**, лаборант-исследователь, отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия;

**Кробинец И. И.**, к.б.н., с.н.с., лаборатория изосерологии, ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России», Санкт-Петербург, Россия;

**Новоселова О. М.**, м.н.с. лаборатории нейрореабилитации ФГБНУ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия;

**Рубаник К. С.**, м.н.с. лаборатории нейрореабилитации ФГБНУ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия;

**Серебрякова М. К.**, н.с. отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, России;

**Прахова Л. Н.**, д.м.н., заведующая лабораторией нейрореабилитации ФГБНУ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия.

## ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) относится к иммунологически опосредованным заболеваниям нервной системы с гетерогенным патогенезом, включающим развивающиеся в определенной степени независимо друг от друга аутоиммунные воспалительные реакции и нейродегенеративные процессы [1]. Одним из признаков РС является разрушение миелина в белом веществе отдельных участков головного и спинного мозга. В очагах демиелинизации обычно обнаруживается высокое содержанием лимфоидных клеток, проникших через гемато-энцефалический барьер [2]. Следует отметить, что к направленной миграции в воспаленные ткани способны антиген-специфические Т-клетки эффекторной памяти с фенотипом CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>, прошедшие антиген-зависимую дифференцировку в периферических лимфоидных органах и утратившие молекулы «хоуминга» в лимфоидную ткань, но обладающие выраженными эффекторными свойствами [3]. Однако столь же важны Т-хелперы центральной памяти (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>), так как именно они формируют пул клеток, способных формировать и поддерживать на определенном уровне клон эффекторных клеток при повторном контакте с антигеном [4].

Среди различных субпопуляций Т-хелперов ведущую роль в патогенезе РС отводилась Т-хелперам 1 типа (Th1), способным с продукции IFN $\gamma$  [5], однако в последние годы появляется все больше работ, посвященных исследованию другой субпопуляции Т-клеток – Т-хелперов 17 (Th17), рассматриваемых в качестве одних из самых перспективных мишеней для терапии РС [6]. С другой стороны, в составе плазмы крови и (СМЖ) больных РС отмечается резкое увеличение уровня IL-21, а также содержания циркулирующих фолликулярных Т-хелперов (Tfh) периферической крови [7], роль которых при данной патологии остается мало изученной. При изучении очагов повреждения нервной ткани при помощи гибридизации *in situ* и методов иммуногистохимии были обнаружены скопления CD3-позитивных лимфоцитов, способных к экспрессии гена IL-17 и синтезу данного цитокина [8]. Несколько позднее также было обнаружено, что белое вещество в очагах поражения содержит еще и CD4-позитивные лимфоциты, секретирующие IL-21 – ключевой цитокин фолликулярных Т-хелперов [9]. Поэтому **целью** данного исследования стал анализ относительного содержания различных субпо-

пуляций Т-хелперов у больных на самых ранних стадиях развития РС.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

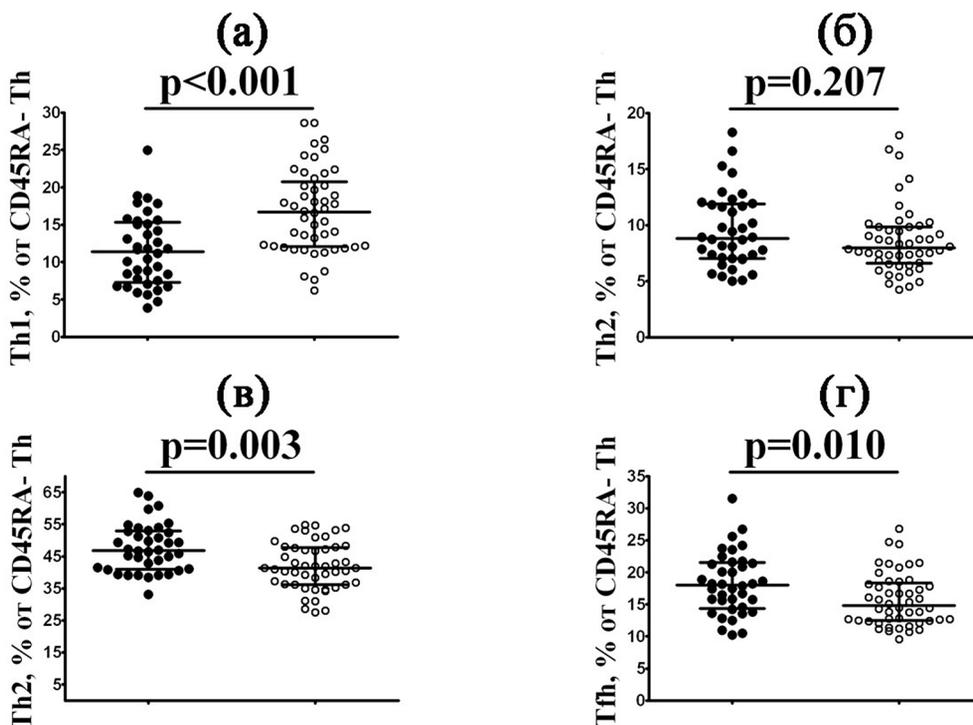
В исследование были включены 38 больных (16 мужчин и 22 женщины) с рецидивирующей формой РС. Диагноз РС устанавливался согласно критериям МакДональда [10]. В исследование вошли пациенты, никогда не получавшие препаратов, изменяющих течение РС (ПИТРС) и системных кортикостероидов в течение последних 90 дней. Всем пациентам проводился стандартный неврологический осмотр с последующей балльной оценкой степени поражения функциональных систем: зрительной, пирамидной, мозжечковой, чувствительной, функций тазовых органов, ствола мозга. Также подсчитывался балл по интегративной шкале EDSS – расширенная шкала инвалидизации [11]. Длительность заболевания РС составляла 1 год (8 мес; 1,5 года), тогда как уровень инвалидизации, выраженная в баллах шкалы EDSS, составляла 1,0 (1,0; 1,5). В группу сравнения были включены 48 условно здоровых доноров, которые достоверно не отличались от больных РС по своему половому и возрастному составу. Исследования были проведены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Исследование одобрено Комиссией по этике ФГБУН «Институт мозга человека им. Н. П. Бехтерева» РАН 23 октября 2014 года.

Объектом исследования служила венозная кровь больных РС и условно здоровых доноров, полученная путем пункции периферической вены и собранная в вакуумные пробирки с содержанием K<sub>3</sub>ЭДТА. Все исследования проводились в день взятия крови. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными Хайдуковым С. В. и соавторами [12]. Для выявления основных популяций Т-хелперов периферической крови с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> применялся следующий набор моноклональных антител (все антитела производства Beckman Coulter Inc., USA): CD3-FHC-AF750 (клон UCNT1) и CD4-PacBlue (клон 13B8.2), CD45RA-FITC

(клон 2H4LDH11LDB9 (2H4)) и CD62L-PE (клон DREG56). В дальнейшем в рамках общего пула Т-хелперов памяти (CD45RA<sup>-</sup>), а также Th клеток центральной (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>) и эффекторной (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) памяти оценивали ко-экспрессию хемокиновых рецепторов при помощи следующего набора антител (все антитела производства Biolegend Inc., USA) – CCR4-BV510 (CD194, клон L291H4), CCR6-PC7 (CD196, клон G034E3), CXCR3-APC (CD183, клон G025H7) и CXCR5-PerCP/Cy5.5 (CD185, клон J252D4). Удаление эритроцитов из образцов проводили с использованием лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, США), к 975 мкл которого *ex tempore* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Beckman Coulter, США). После разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора при 330 g в течение 7 минут, после чего надосадок удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе с pH 7,2–7,4, содержащем 2% параформальдегида (Sigma-Aldrich, США). Анализ образцов прово-

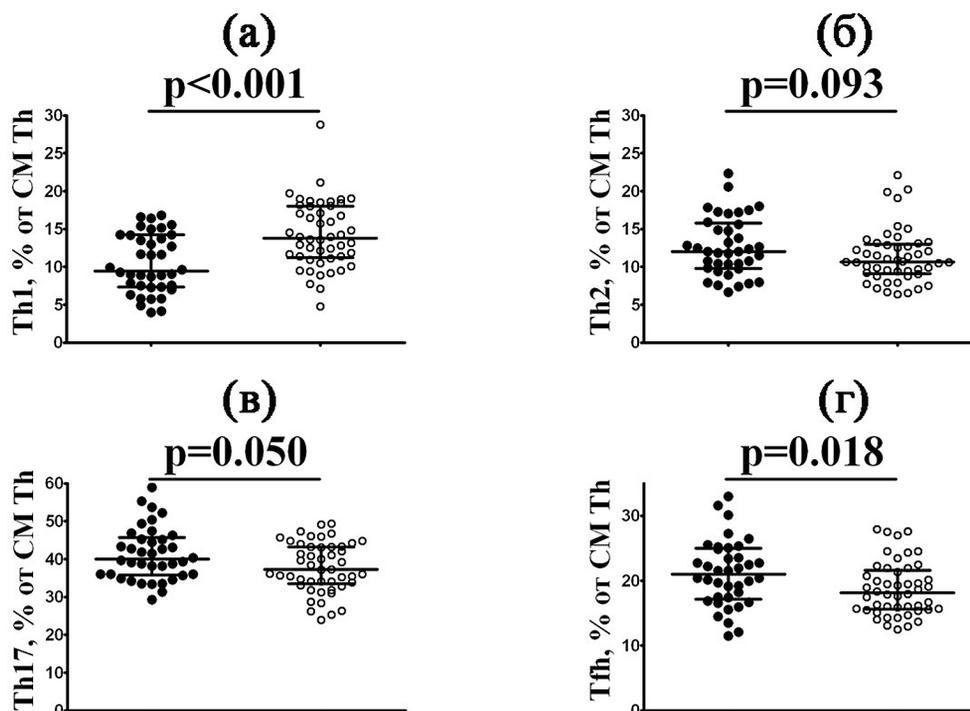
дили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенный тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.5a (Beckman Coulter, США). Анализ коэкспрессии хемокиновых рецепторов CCR4, CCR6, CXCR3 и CXCR5 проводили с применением тактики «гейтирования», основанной на иерархических дендрограммах для общего пула CD45RA-негативных Th памяти, а также CM и EM Th, описанной ранее [13]. Th1 клеток определяли как CXCR5<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>CCR4<sup>-</sup>, Th2 лимфоциты обладали фенотипом CXCR5<sup>-</sup>CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>CCR4<sup>+</sup>, тогда как фенотип Th17 и Tfh описывали как CXCR5<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup> и CXCR5<sup>+</sup>, соответственно.

Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, USA) и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., USA). Результаты выражали в виде % позитивных клеток от искомой популяции и приводили в виде медианы и интерквартильного размаха (Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>).



**Рисунок 1.** Относительное содержание Th1, Th2, Th17 и фолликулярных Т-хелперов (Tfh) среди CD45RA-CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> лимфоцитов периферической крови больных РС.

**Примечание:** Здесь и далее на рисунках 2 и 3: черным обозначены результаты, полученные для больных РС (n=38), белым – результаты группы контроля (n=48). Результаты приведены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q<sub>25</sub> и Q<sub>75</sub>). Достоверные различия указаны согласно непараметрическому U-критерию Манна-Уитни.



**Рисунок 2.** Относительное содержание Th1, Th2, Th17 и фолликулярных Т-хелперов (Тfh) среди Т-хелперов центральной памяти (CD45RA-CD62L<sup>+</sup>) лимфоцитов периферической крови больных РС.

Сравнение уровней основных субпопуляций Th у больных РС и группы контроля проводили при помощи U-критерия Манна-Уитни.

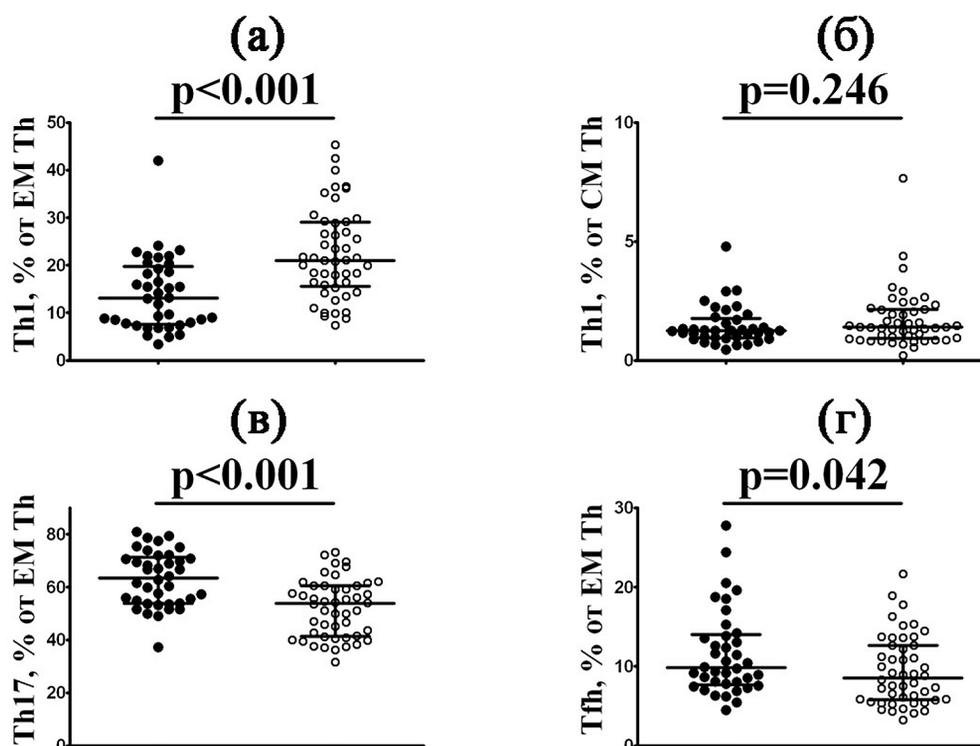
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ относительного и абсолютного содержания общего числа Т-лимфоцитов периферической крови с фенотипом CD3<sup>+</sup> не выявил достоверных различий между больными РС и группой сравнения (76,83% (71,93; 80,26) против 78,29% (72,92; 83,46) при  $p=0,372$ , а также 1472 кл/1 мкл (1092; 1770) против 1324 кл/1 мкл (1136; 1615) при  $p=0,492$ , соответственно). Нами также не было обнаружено различий между сравниваемыми группами по относительному и абсолютному содержанию Th клеток с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (48,73% (41,73; 52,20) против 49,14% (42,69; 53,05) при  $p=0,629$  и 909 кл/1 мкл (702; 1112) против 808 кл/1 мкл (685; 1041) при  $p=0,548$ , соответственно).

Было показано, что относительное содержание CD45RA-CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток у больных РС в рамках общего пула лимфоцитов периферической крови снижается относительно группы контроля (28,72% (26,44; 33,09) и 32,59% (28,84; 37,18) при  $p=0,027$ ), тогда как по абсолютному

содержанию клеток данного фенотипа различий отмечено не было (561 кл/1 мкл (403; 684) и 557 кл/1 мкл (462; 730),  $p=0,465$ ). Результаты анализа распределения общего пула Th памяти по основным субпопуляциям «поляризованных» Th клеток приведены на **Рис. 1**. Показано, что при РС достоверно снижается доля Th1 лимфоцитов (с 16,69% (12,09; 20,72) до 11,41% (7,50; 15,12) при  $p<0,001$ ), тогда как уровни циркулирующих Th17 и фолликулярных Th достоверно превосходят значения, полученные для группы контроля (46,81% (41,09; 52,74) против 41,35% (36,21; 47,69) при  $p=0,003$  и 18,01% (14,54; 21,41) против 14,79% (12,46; 18,34) при  $p=0,010$ , соответственно).

В ходе дальнейших исследований общий пул циркулирующих в периферической крови Th памяти был разделен на две субпопуляции – Т-хелперы центральной памяти (СМ) с фенотипом CD45RA-CD62L<sup>+</sup>, «патрулирующие» периферические лимфоидные органы в поисках повторного контакта со специфическим антигеном, и Т-хелперы эффекторной памяти (ЕМ) с фенотипом CD45RA-CD62L<sup>-</sup>, которые способны покидать кровотоки и направленно мигрировать в очаг воспаления для выполнения там



**Рисунок 3.** Относительное содержание Th1, Th2, Th17 и фолликулярных Т-хелперов (Тfh) среди Т-хелперов эффекторной памяти ( $CD45RA^-CD62L^-$ ) лимфоцитов периферической крови больных РС.

эффекторных функций. Так, не было отмечено достоверных различий ( $p=0,244$  и  $p=0,370$ , соответственно) по относительному и абсолютному содержанию СМ клеток –  $CD45RA^-CD62L^+$  Th у больных РС составляли 21,19% (18,72; 24,78) от общего пула Th при концентрации в 401 кл/1 мкл (284; 511), тогда как в группе контроля эти значения составили 19,84% (17,12; 23,25) и 338 кл/1 мкл (279; 497), соответственно. Анализ ко-экспрессии хемокиновых рецепторов СМ Th у больных РС выявил достоверное снижение доли Th1 клеток (с 13,80% (11,24; 18,03) до 9,46% (7,35; 14,19) при  $p<0,001$ ) и увеличение содержания Тfh клеток (с 18,16% (15,60; 21,63) до 20,98% (17,39; 24,89) при  $p=0,018$ ), тогда как по содержанию Th2 и Th17 сравниваемые группы достоверно не различались (Рис. 2).

При сравнении относительного и абсолютного содержания EM Th с фенотипом  $CD45RA^-CD62L^-$  больных РС с группой контроля было отмечено достоверное снижение клеток данного типа (8,08% (6,69; 10,63) против 11,83% (9,95; 14,34) при  $p<0,001$ , а также 140 кл/1 мкл (108; 256) против 210 кл/1 мкл (177; 256) при  $p=0,002$ ). Также нами были выявлены существенные из-

менения субпопуляционного состава «поляризованных» Th клеток при РС, связанные со снижением уровня Th1 (с 21,01% (15,54; 29,01) до 13,08% (7,76; 19,27) при  $p<0,001$ ) и увеличением долей Th17 (с 53,77% (41,39; 60,54) до 63,43% (53,77; 70,78) при  $p<0,001$ ) и фолликулярных Th (с 8,56% (5,81; 12,65) до 9,84% (7,78; 13,86) при  $p=0,042$ ), тогда как уровень Th2 достоверно не различался между группами (Рис. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами результаты указывают на тот факт, что уже на самых ранних этапах развития РС в периферической крови больных наблюдается увеличение крови Th17 и Тfh клеток, тогда как относительное содержание Th1 лимфоцитов достоверно снижается.

В рамках проведенного исследования нами отмечалось увеличение уровней  $CXCR5^+$  Тfh клеток как в пределах общего пула клеток памяти, так и среди СМ и EM Т-хелперов периферической крови. Следует отметить, что результаты по динамике данной популяции Th весьма противоречивы. Так, у больных с рецидивирующим РС в стадии клинической ремиссии наблюда-

лось увеличение уровня ICOS<sup>+</sup> Tfh клеток периферической крови и прирост экспрессии мРНК IL-21R и ICOS [14]. Более того, при прогрессировании РС экспрессия ICOS повышалась и в клеточной фракции СМЖ, что косвенно указывает на активацию Tfh не только на периферии, но и в пределах ЦНС. Эти данные согласуются с результатами гистологических исследований, показавших присутствие IL-21R<sup>+</sup> и IL-21<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-клеток как в активных, так и в хронических очагах поражения нервной ткани [9]. В рамках другого исследования в периферической крови пациентов с рецидивирующим РС по сравнению с группой контроля было обнаружено увеличенное содержание CCR7<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> Tfh клеток памяти, которое коррелировало с показателями шкалы EDSS, уровнями IL-21 в плазме крови, а также титрами антител против MBP и MOG [7]. Эти результаты косвенно подтверждают собственные данные о приросте доли Tfh среди EM Th, которые способны покидать кровотоки и мигрировать в периферические ткани, включая очаги воспаления в пределах нервной системы, где эти клетки могут принимать участие в формировании третичной лимфоидной ткани и регулировать функции В-лимфоцитов и плазматических клеток. Однако, некоторыми исследователями у больных РС без проведения терапии достоверных различий с контрольной группой отмечено не было как по относительному содержанию CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> Tfh, так и CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CXCR5<sup>+</sup> Tfh клеток памяти [15].

Вместе с тем, нами также отмечалось увеличение уровня Th17, которое, в первую очередь, было связано с приростом процентного содержания этих клеток в пределах пула EM Th, обладающих выраженными эффекторными свойствами. Как уже отмечалось ранее, активация аутореактивных клонов Th17 рассматриваются в качестве одной из основных причин поражения нервной ткани при РС. Вместе с тем, формирования пула этих клеток тесно связано с процессами, протекающими в периферических лимфоидных тканях, в которых происходит формирования оптимального для дифференцировки Th17 цитокинового микроокружения. Так, было показано, что уровень экспрессии генов таких провоспалительных цитокинов как IL-1 $\beta$  и IL-6 (рассматриваемых в качестве одного из факторов для дифференцировки Th0 в сторону Th17), равно как и их содержание в сыворотке крови и СМЖ больных РС тесно связаны с тяжестью заболевания и его прогрессией [16].

Во-вторых, столь же существенную роль в формировании пула эффекторных Th17, как уже отмечалось ранее, играет IL-23, сывороточные концентрации данного цитокина у больных рассеянным склерозом существенно превосходят таковые условно здоровых доноров [17]. В третьих, эффекторными цитокинами лимфоцитов данной популяции являются IL-17A, IL-17F и IL-22, роль которых в патогенезе РС (в силу их высокой концентрации у больных) в настоящее время активно обсуждается в литературе [18]. Именно под действием IL-17 и IL-22, рецепторы для которых представлены на эндотелиальных клетках, входящих в состав гемато-энцефалического барьера, нарушается структура плотных контактов как в условиях *in vivo*, так и в условиях *in vitro* [19]. Более того, результаты анализа образцов биопсии тканей головного мозга больных РС показали, что ген, кодирующий IL-17A, экспрессируется в них на очень высоком уровне [6], причем в очагах повреждения нервной ткани за это отвечали именно CD3<sup>+</sup> клетки с морфологией лимфоцитов [8]. По-видимому, Th17 в составе нервной ткани отвечают за инфильтрацию нейтрофилами последней, тогда как Tfh могут принимать активное участие в формировании ответа, опосредованного В-лимфоцитами, в непосредственной близости от очага поражения, что может сопровождаться синтезом аутоантител и усилением активности нейтрофилов. Таким образом, анализ Th даст возможность с новых позиций подойти к причинам развития РС, а детальное исследование их отдельных субпопуляций в перспективе позволит обнаружить новые клеточные маркеры для анализа прогрессирования заболевания, предсказания тяжести его развития и течения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Kamm C. P., Uitdehaag B. M., Polman C. H. Multiple sclerosis: current knowledge and future outlook. *Eur Neurol* 2014, 72, 132–141.
2. Sospedra M., Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005, 23, 683–747.
3. Кудрявцев И. В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки. *Российский иммунологический журнал*. 2014, 8, 4 (17), 947–964. [Kudryavtsev I. V. Memory T cells: major populations and stages of differentiation. *Russian Journal of Immunology*. 2014, 8, 4 (17), 947–964.]
4. Сохоневич Н. А., Хазиахматова О. Г., Юрова К. А., Шуплетова В. В., Литвинова Л. С. Фенотипическая характеристика и функциональные особенности Т- и В-клеток иммунной памяти. *Цитология* 2015, 57 (5), 311–318. [Sokhonevich N. A., Khaziakhmatova O. G., Yurova K. A., Shupletova V. V., Litvinova L. S.]

- va O. G., Yurova K. A., Shupletsova V. V., Litvinova L. S. Phenotypic characterization and functional features of memory T- and B-cells. *Tsitologia* 2015, 57 (5), 311–318].
5. Fletcher J. M., Lalor S. J., Sweeney C. M., Tubridy N., Mills K. H. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 2010, 162, 1–11.
  6. Volpe E., Battistini L., Borsellino G. Advances in T helper 17 cell biology: pathogenic role and potential therapy in multiple sclerosis. *Mediators Inflamm* 2015, 2015, 475158.
  7. Fan X., Jin T., Zhao S., Liu C., Han J., Jiang X., Jiang Y. Circulating CCR7+ICOS+ memory T follicular helper cells in patients with multiple sclerosis. *PLoS One* 2015, 10 (7), e0134523.
  8. Tzartos J. S., Friese M. A., Craner M. J., Palace J., Newcombe J., Esiri M. M., Fugger L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008, 172 (1), 146–155.
  9. Tzartos J. S., Craner M. J., Friese M. A., Jakobsen K. B., Newcombe J., Esiri M. M., Fugger L. IL-21 and IL-21 receptor expression in lymphocytes and neurons in multiple sclerosis brain. *Am J Pathol* 2011, 178 (2), 794–802.
  10. Polman C. H., Reingold S. C., Banwell B., Clanet M., Cohen J. A., Filippi M., Fujihara K., Havrdova E., Hutchinson M., Kappos L., Lublin F. D., Montalban X., O'Connor P., Sandberg-Wollheim M., Thompson A. J., Waubant E., Weinshenker B., Wolinsky J. S. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011, 69 (2), 292–302.
  11. Kurtzke J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983, 33 (11), 1444–1452, Kappos L. Slightly modified, version 09/08.
  12. Хайдуков С. В., Байдун Л. А., Зурочка А. В., Тоголян А. А. Стандартизованная технология «исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» (проект). *Медицинская иммунология* 2012, 14 (3), 255–268. [Khaydukov S., Baidun L., Zurochka A., Totolyan A. *Medical Immunology (Russia)* 2012, 14 (3), 255–268].
  13. Кудрявцев И. В., Борисов А. Г., Кробинец И. И., Савченко А. А., Серебрякова М. К., Тоголян А. А. Хемокиновые рецепторы на Т-хелперах различного уровня дифференцировки: основные субпопуляции. *Медицинская иммунология* 2016, 18 (3), 239–250. [Kudryavtsev I. V., Borisov A. G., Krobinec I. I., Savchenko A. A., Serebriakova M. K., Totolian A. A. Chemokine receptors at distinct differentiation stages of T-helpers from peripheral blood. *Medical Immunology (Russia)* 2016, 18 (3), 239–250.].
  14. Romme Christensen J., Börnsen L., Ratzer R., Piehl F., Khademi M., Olsson T., Sørensen P. S., Sellebjerg F. Systemic inflammation in progressive multiple sclerosis involves follicular T-helper, Th17- and activated B-cells and correlates with progression. *PLoS One* 2013, 8 (3), e57820.
  15. Cunill V., Massot M., Clemente A., Calles C., Andreu V., Núñez V., López-Gómez A., Díaz R. M., Jiménez M. L. R., Pons J., Vives-Bauzá C., Ferrer J. M. Relapsing-remitting multiple sclerosis is characterized by a T follicular cell pro-inflammatory shift, reverted by dimethyl fumarate treatment. *Front Immunol* 2018, 9, 1097.
  16. Rovaris M., Barnes D., Woodrofe N., du Boulay G. H., Thorpe J. W., Thompson A. J., McDonald W. I., Miller D. H. Patterns of disease activity in multiple sclerosis patients: a study with quantitative gadolinium-enhanced brain MRI and cytokine measurement in different clinical subgroups. *J Neurol* 1996, 243, 536–542.
  17. Shajarian M., Alsahebhosoul F., Etemadifar M., Sedaghat N., Shahbazi M., Firouzabadi F. P., Dezashibi H. M. IL-23 plasma level measurement in relapsing remitting multiple sclerosis (RRMS) patients compared to healthy subjects. *Immunol Invest* 2015, 44, 36–44.
  18. Babaloo Z., Aliparasti M. R., Babaiea F., Almasi S., Baradaran B., Farhoudi M. The role of Th17 cells in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: interleukin-17A and interleukin-17F serum levels. *Immunol Lett* 2015, 164, 76–80.
  19. Kebir H., Kreymborg K., Ifergan I., Dodelet-Devillers A., Cayrol R., Bernard M., Giuliani F., Arbour N., Becher B., Prat A. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 2007, 13 (10), 1173–1175.

## IMBALANCE IN PERIPHERAL BLOOD “POLARIZED” T-HELPER SUBSETS DURING MULTIPLY SCLEROSIS

© 2019 I. V. Kudryavtsev<sup>1,2\*</sup>, A. G. Ilves<sup>3</sup>, A. V. Il'chenko<sup>1</sup>,  
I. I. Krobinets<sup>4</sup>, O. M. Novoselova<sup>3</sup>, K. S. Rubanik<sup>3</sup>,  
M. K. Serebryakova<sup>1</sup>, L. N. Prakhova<sup>3</sup>

\*E-mail: igorek1981@yandex.ru

<sup>1</sup>Institute of Experimental Medicine (FSBSI “IEM”), St. Petersburg, Russia;

<sup>2</sup>N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, St. Petersburg, Russia;

<sup>3</sup>N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences (IHB RAS), St. Petersburg, Russia;

<sup>4</sup>Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russia

Received: 22.05.2019. Accepted: 27.06.2019

Multiple sclerosis (MS) is the inflammatory disease of the central nervous system characterized by multifocal areas of demyelination and immune cell infiltration. In the current study, we analysed the frequencies and the phenotypes of “polarized” Th cell subsets in peripheral blood of multiple sclerosis patients (n=38, with low disease duration – 1 year (8 month; 1,5 years) and low EDSS – 1,0 (1,0; 1,5)) and healthy control group (n=48). We show that within CD45RA<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> subset the frequencies of Th17 and follicular Th (Tfh) cells were significantly higher in patients while the levels of Th1 cells were significantly lower in comparison to control group. Similarly, in central memory CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup> Th the relative number of Th1 cells was reduced while frequencies of Tfh subset were increased in MS patients if compared to control. Finally, MS patients showed increased frequency of Th17 and Tfh cells in CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> Th subset compared to control while Th1 were lower in patients group. It seems that Th17 cells infiltrating the nervous tissue could be responsible for neutrophil infiltration, while Tfh cells could take part in B-cell-mediated immune response nearby to site of inflammation and may be accompanied by production of self-reactive antibodies as well as augmented neutrophilic activity.

*Key words:* multiple sclerosis, flow cytometry, chemokine receptors, follicular Th cells, Th17

**Authors:**

**Kudryavtsev I. V.**, PhD, senior researcher, department of immunology, “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russia; senior researcher, department of oncoimmunology, N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, St. Petersburg, Russia;

197376, St. Petersburg, Russia, acad. Pavlov str., 12, dept. of immunology, “Institute of Experimental Medicine”.

Phone.: +7 812 234-1669, **E-mail:** igorek1981@yandex.ru;

**Ilves A. G.**, PhD, senior researcher, laboratory of neuroimmunology, N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences St. Petersburg, Russia;

**Il'chenko A. V.**, research assistant, department of immunology, “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russia;

**Krobinets I. I.**, PhD, Senior Research Associate, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russia;

**Novoselova O. M.**, junior researcher, laboratory of neurorehabilitation, N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia;

**Rubanik K. S.**, junior researcher, laboratory of neurorehabilitation, N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia;

**Serebriakova M. K.**, researcher, department of immunology, Federal State Budgetary Scientific Institution “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russia;

**Prakhova L. N.**, MD, Head of the laboratory of neurorehabilitation, N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia.

## СОДЕРЖАНИЕ CD-ЛИМФОЦИТОВ И ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ИММУНИТЕТА У СПОРТСМЕНОВ ПРИ РАЗНОМ СОСТОЯНИИ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

© 2019 г. В. А. Колупаев<sup>1\*</sup>, С. Л. Сашенков<sup>1</sup>, И. Ю. Мельников<sup>1</sup>,  
Н. А. Лифанов<sup>1</sup>, И. Л. Колупаева<sup>2</sup>

\*E-mail: vitalico@mail.ru

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Уральский государственный университет физической культуры», Челябинск, Россия

Поступила: 22.05.2019. Принята: 27.06.2019

В работе представлены результаты распределения обследованных спортсменов с анаэробным и аэробным энергообеспечением мышечной деятельности и различной динамикой физических нагрузок в цикле года на группы в соответствии с уровнем фагоцитарной, лизосомальной и индуцированной НСТ-активности Нф периферической крови и сравнения показателей содержания гуморальных факторов иммунитета и CD-лимфоцитов у представителей этих групп. Установлено отсутствие существенного влияния вида двигательной деятельности на представительство обследованных спортсменов в составе наиболее многочисленных групп однотипных сочетаний уровня показателей фагоцитарной, лизосомальной и НСТ-активности Нф и наличие значимой связи доли обследуемых спортсменов с определенным состоянием Нф от сезона наблюдения. При нормальном уровне индуцированного НСТ-теста Нф разные сочетания уровней фагоцитарной и лизосомальной активности этих клеток сопровождались существенными межгрупповыми различиями уровня содержания CD20<sup>+</sup>-лимфоцитов. При низком уровне индуцированной НСТ-активности Нф в сформированных группах отмечали существенные различия содержания CD25<sup>+</sup> и IgG, а в ряду высоких значений индуцированного НСТ-теста Нф – достоверными различиями содержания CD4<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> и IgA в периферической крови спортсменов.

**Ключевые слова:** фагоцитарная, лизосомальная и НСТ-активность нейтрофилов, CD-лимфоциты, физические нагрузки, цитокины

DOI: 10.31857/S102872210007252-2

**Адрес:** 454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Колупаев Виталий Анатольевич. Тел.: +79068602385, 8(351)2612596,

**E-mail:** vitalico@mail.ru

**Авторы:**

**Колупаев В. А.**, д.б.н., доцент, заведующий кафедрой физической культуры ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия;

**Сашенков С. Л.**, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия;

**Мельников И. Ю.**, к.м.н., доцент, доцент кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия;

**Лифанов Н. А.**, старший преподаватель кафедры физической культуры ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия;

**Колупаева И. Л.**, к.б.н., старший преподаватель кафедры физической реабилитации и спортивной медицины ФГБОУ ВО «Уральский государственный университет физической культуры», Челябинск, Россия.

### ВЕДЕНИЕ

Тесная взаимосвязь механизмов неспецифической резистентности организма с деятельностью системы иммунитета в настоящее время не вызывает сомнений [1, 2]. Ранее нами были показаны существенные изменения показателей функционального состояния нейтрофилов периферической крови спортсменов как под

влиянием физических нагрузок [3], так и под влиянием сезонной динамики условий внешней среды [4]. При этом у спортсменов отмечаются выраженные изменения содержания CD-лимфоцитов и гуморальных факторов иммунитета [5]. В этой связи представляет определенный интерес выявление закономерностей взаимосвязи механизмов неспецифической резистентности, осуществляемых с участием нейтрофилов периферической крови, с деятельностью механизмов иммунного надзора у спортсменов под влиянием физических нагрузок и условий внешней среды.

**Цель** настоящей работы состояла в оценке состояния гуморальных факторов иммунитета и содержания CD-лимфоцитов у спортсменов в зависимости от состояния показателей функционального состояния нейтрофилов у них.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено изучение показателей фагоцитарной, лизосомальной и НСТ-активности нейтрофилов (Нф) традиционными методами [6]; содержания CD-лимфоцитов в крови методом иммунофенотипирования; сывороточных иммуноглобулинов IgA, IgG, IgM, а также C1, C2, C3, C4 и C5-компонентов комплемента, интерлейкина-1 $\alpha$ , интерлейкина-1 $\alpha$ , интерлейкина-4,  $\gamma$ -интерферона методом иммуноферментного анализа, гемолитической активности комплемента – методом титрования, циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) – методом precipitation полиэтиленгликолем у 3-х групп спортсменов с преимущественно анаэробным (борцы, n=65) или аэробным (лыжники-гонщики, n=110 и скороходы, n=53) энергообеспечением мышечной деятельности и с разной динамикой физических нагрузок в цикле года: с высоким уровнем аэробных физических нагрузок осенью и зимой (лыжники-гонщики) и с высоким уровнем физических нагрузок весной и летом (борцы и скороходы). Для группировки обследованных спортсменов с однотипным уровнем функционального состояния Нф показатели индекса фагоцитоза этих клеток, соответствующие значению региональных норм индексировали как «200», значения ниже нормативных индексировали как «100», а значения, превышающие нормативные – как «300». Аналогично показатели индекса лизосомальной и индуцированной НСТ-активности Нф, соответствующие значениям региональных норм индексировали как «20» и «2» – соответственно, значения этих показателей ниже нормативных обозначали как «10»

и «1», а их значения, превышающие нормы – как «30» и «3» – соответственно. Далее распределение спортсменов на подгруппы независимо от вида их двигательной активности осуществляли на основе одинаковых комбинаций у обследуемых разных по уровню показателей фагоцитарной, лизосомальной и индуцированной НСТ-активности Нф. Все лабораторные исследования проведены на базе НИИ иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ (директор НИИ иммунологии, президент ФГБОУ ВО ЮУГМУ – заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, д.м.н., профессор И. И. Долгушин).

Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием пакета программ STATISTICA 6.0. Достоверность межгрупповых различий определяли по критерию Манна-Уитни, а множественные сравнения по критерию Краскела-Уоллиса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ результатов оценки показателей фагоцитарной, лизосомальной и НСТ-активности Нф периферической крови у обследованных спортсменов на соответствие их величины нормативным значениям показал, что в зависимости от вида двигательной деятельности в 64–73% случаев (в среднем у 68% обследованных спортсменов) отмечались сниженные значения активности фагоцитоза, в 56–64% случаев (в среднем в 61%) – сниженные показатели индекса фагоцитоза, а в 66–73% случаев (в среднем в 71%) – низкий уровень фагоцитарного числа Нф. В 47–52% наблюдений отмечался нормальный уровень индекса лизосомальной активности, а в 49–60% наблюдений – нормальный уровень индуцированного НСТ-теста этих клеток. При этом у 66–81% обследованных спортсменов показатели спонтанной НСТ-активности Нф характеризовались высокими значениями. Для снижения пространства состояний Нф в зависимости от сочетания низкой, нормальной или высокой градации каждого из показателей были использованы значения индекса фагоцитоза, индекса лизосомальной активности и индуцированной НСТ-активности этих клеток (**Табл. 1**).

В результате уменьшения с 6 до 3 числа изучаемых показателей, используемых для комплексной диагностики состояния Нф, из 27 возможных сочетаний разных по уровню фагоцитоза, лизосомальной и индуцированной НСТ-актив-

Таблица 1. Доля наблюдений атлетов с разным уровнем показателей состояния нейтрофилов

Оценка состояния Нф	Вид спорта			Сезон наблюдения				Всего
	борцы	лыжники	сороходы	зима	весна	лето	осень	
1-1-1, %	2	8	5	8	4	1	2	15
	3,08	7,27	9,43	8,70	12,12	2,17	3,51	6,58
1-1-2, %	8	11	4	14	4	4	1	23
	12,31	10,00	7,55	15,22	12,12	8,70	1,75	10,09
1-1-3, %	0	1	1	2	0	0	0	2
	0,00	0,91	1,89	2,17	0,00	0,00	0,00	0,88
1-2-1, %	5	10	5	5	4	4	7	20
	7,69	9,09	9,43	5,43	12,12	8,70	12,28	8,77
1-2-2, %	6	21	7	20	5	7	2	34
	9,23	19,09	13,21	21,74	15,15	15,22	3,51	14,91
1-2-3, %	4	4	1	2	0	2	5	9
	6,15	3,64	1,89	2,17	0,00	4,35	8,77	3,95
1-3-1, %	4	8	4	7	0	4	5	16
	6,15	7,27	7,55	7,61	0,00	8,70	8,77	7,02
1-3-2, %	8	8	4	13	1	1	5	20
	12,31	7,27	7,55	14,13	3,03	2,17	8,77	8,77
2-1-1, %	0	2	1	0	3	0	0	3
	0,00	1,82	1,89	0,00	9,09	0,00	0,00	1,32
2-1-2, %	1	1	0	1	1	0	0	2
	1,54	0,91	0,00	1,09	3,03	0,00	0,00	0,88
2-1-3, %	1	1	0	1	0	0	1	2
	1,54	0,91	0,00	1,09	0,00	0,00	1,75	0,88
2-2-1, %	1	3	4	1	3	2	2	8
	1,54	2,73	7,55	1,09	9,09	4,35	3,51	3,51
2-2-2, %	5	6	5	7	1	5	3	16
	7,69	5,45	9,43	7,61	3,03	10,87	5,26	7,02
2-2-3, %	0	1	2	0	1	2	0	3
	0,00	0,91	3,77	0,00	3,03	4,35	0,00	1,32
2-3-1, %	1	1	0	0	0	0	2	2
	1,54	0,91	0,00	0,00	0,00	0,00	3,51	0,88
2-3-2, %	1	1	1	1	1	1	0	3
	1,54	0,91	1,89	1,09	3,03	2,17	0,00	1,32
3-1-1, %	1	0	0	0	0	0	1	1
	1,54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,75	0,44
3-1-2, %	3	9	1	5	2	4	2	13
	4,62	8,18	1,89	5,43	6,06	8,70	3,51	5,70

Оценка состояния Нф	Вид спорта			Сезон наблюдения				Всего
	борцы	лыжники	скороходы	зима	весна	лето	осень	
3-1-3, %	3	0	1	0	0	0	4	4
	4,62	0,00	1,89	0,00	0,00	0,00	7,02	1,75
3-2-1, %	2	1	2	1	1	2	1	5
	3,08	0,91	3,77	1,09	3,03	4,35	1,75	2,19
3-2-2, %	5	6	2	2	1	4	6	13
	7,69	5,45	3,77	2,17	3,03	8,70	10,53	5,70
3-2-3, %	3	2	0	0	0	2	3	5
	4,62	1,82	0,00	0,00	0,00	4,35	5,26	2,19
3-3-1, %	0	1	1	0	0	0	2	2
	0,00	0,91	1,89	0,00	0,00	0,00	3,51	0,88
3-3-2, %	1	4	2	2	1	1	3	7
	1,54	3,64	3,77	2,17	3,03	2,17	5,26	3,07
Итого: %	65	110	53	92	33	46	57	228
	28,51	48,25	23,25	40,35	14,47	20,18	25,00	100

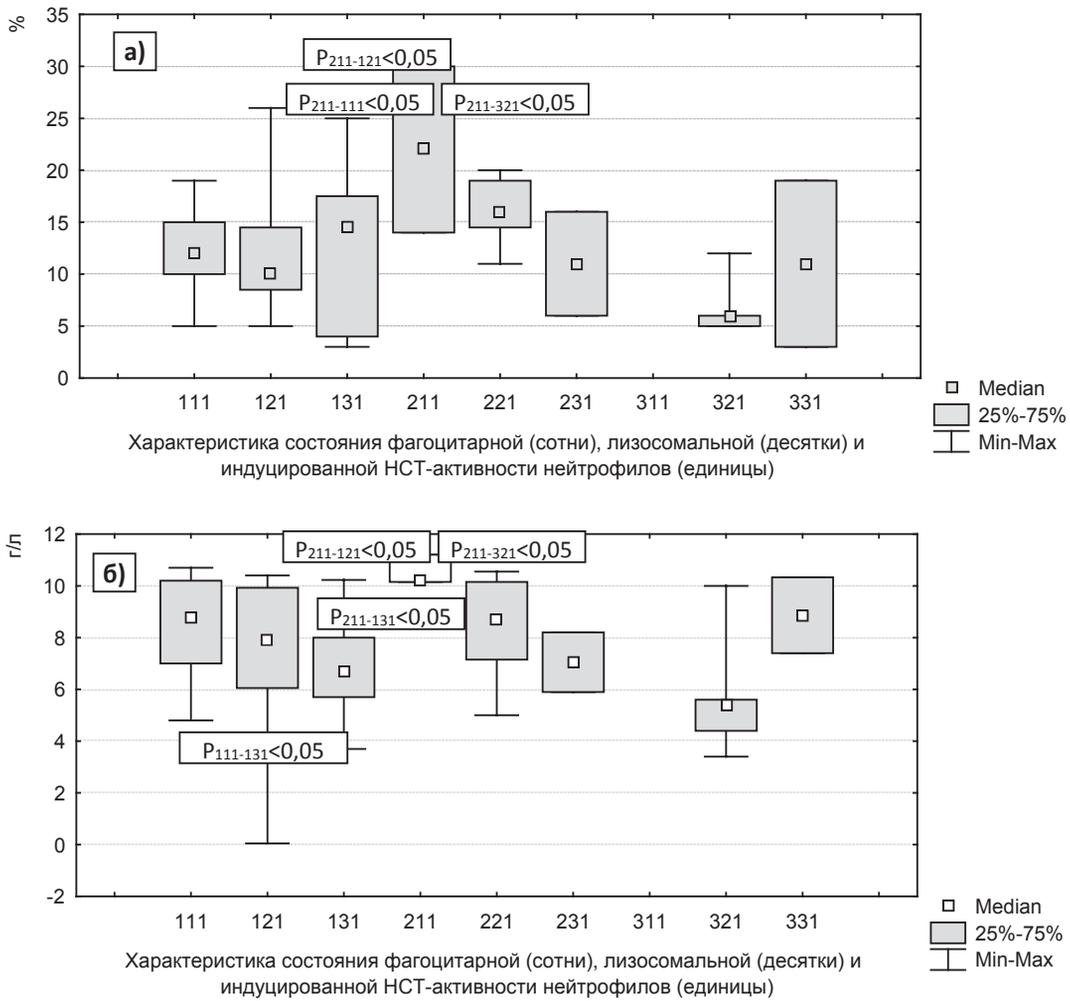
**Условные обозначения:** в графе “Оценка состояния Нф” 1-, 2-, 3- — низкий, нормальный или высокий уровень индекса фагоцитоза (первая позиция), индекса лизосомальной активности (вторая позиция) и индуцированной НСТ-активности Нф (третья позиция)

ности гранулоцитов в выборке обследованных атлетов было зафиксировано 24 варианта функционального состояния этих клеток. При этом ни в одной из исследуемых групп спортсменов не выявлено наличие состояний с сочетанием высокого уровня индекса лизосомальной активности Нф с высоким уровнем индуцированной НСТ-активности этих клеток.

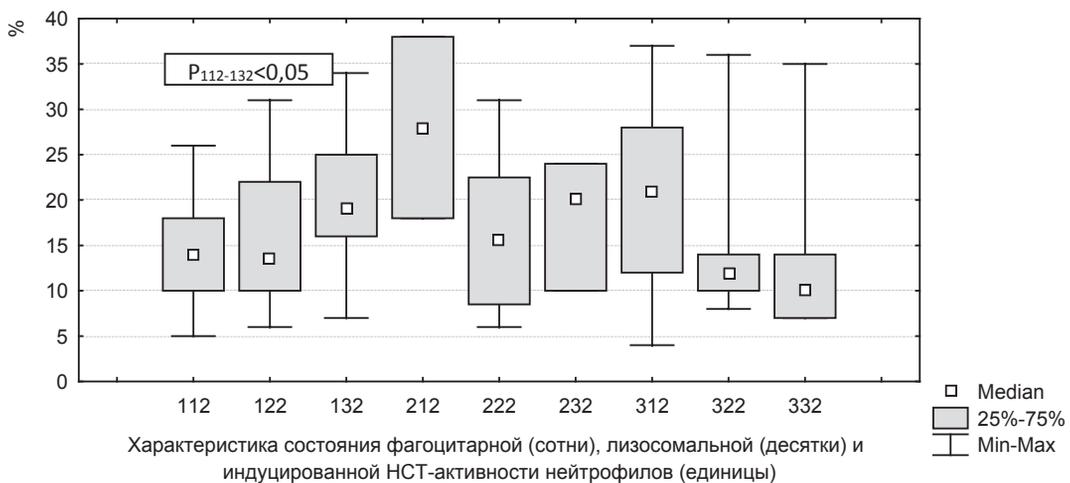
Из 24 выявленных сочетаний исследуемых показателей эффекторных функций Нф наибольшая доля наблюдений (75%) представляла 9 состояний: сочетание низкого уровня индекса фагоцитоза с нормальным уровнем индекса лизосомальной активности и индуцированной НСТ-активности (14,9% наблюдений); низкого уровня индекса фагоцитоза и индекса лизосомальной активности с нормальными значениями индуцированной НСТ-активности (10,1%); низкого уровня индекса фагоцитоза и индуцированной НСТ-активности в сочетании с нормальным уровнем индекса лизосомальной активности, а также низкого индекса фагоцитоза с нормальными значениями индуцированной НСТ-активности и повышенными значениями индекса лизосомальной активности (по 8,8%); низкого уровня фагоцитоза и индуцированной НСТ-ак-

тивности в сочетании с высоким уровнем лизосомальной активности, а также среднего уровня показателей фагоцитарной, лизосомальной и индуцированной НСТ-активности (по 7,0%); сочетания низкого уровня всех трех исследуемых показателей (6,6%); высокого уровня индекса фагоцитоза в сочетании со средним уровнем индуцированной НСТ-активности и низким или средним уровнем индекса лизосомальной активности Нф (по 5,7% наблюдений). При анализе ещё 5 состояний комплексной диагностики фагоцитарной, лизосомальной и индуцированной НСТ-активности Нф отмечались либо единичные наблюдения, либо отсутствие наблюдений среди представителей того или иного исследуемого вида спорта. В итоге совокупный объем наблюдений 14 наиболее представительных сочетаний данных показателей активности Нф у спортсменов составил 204 наблюдения или 89,5% от обследованных.

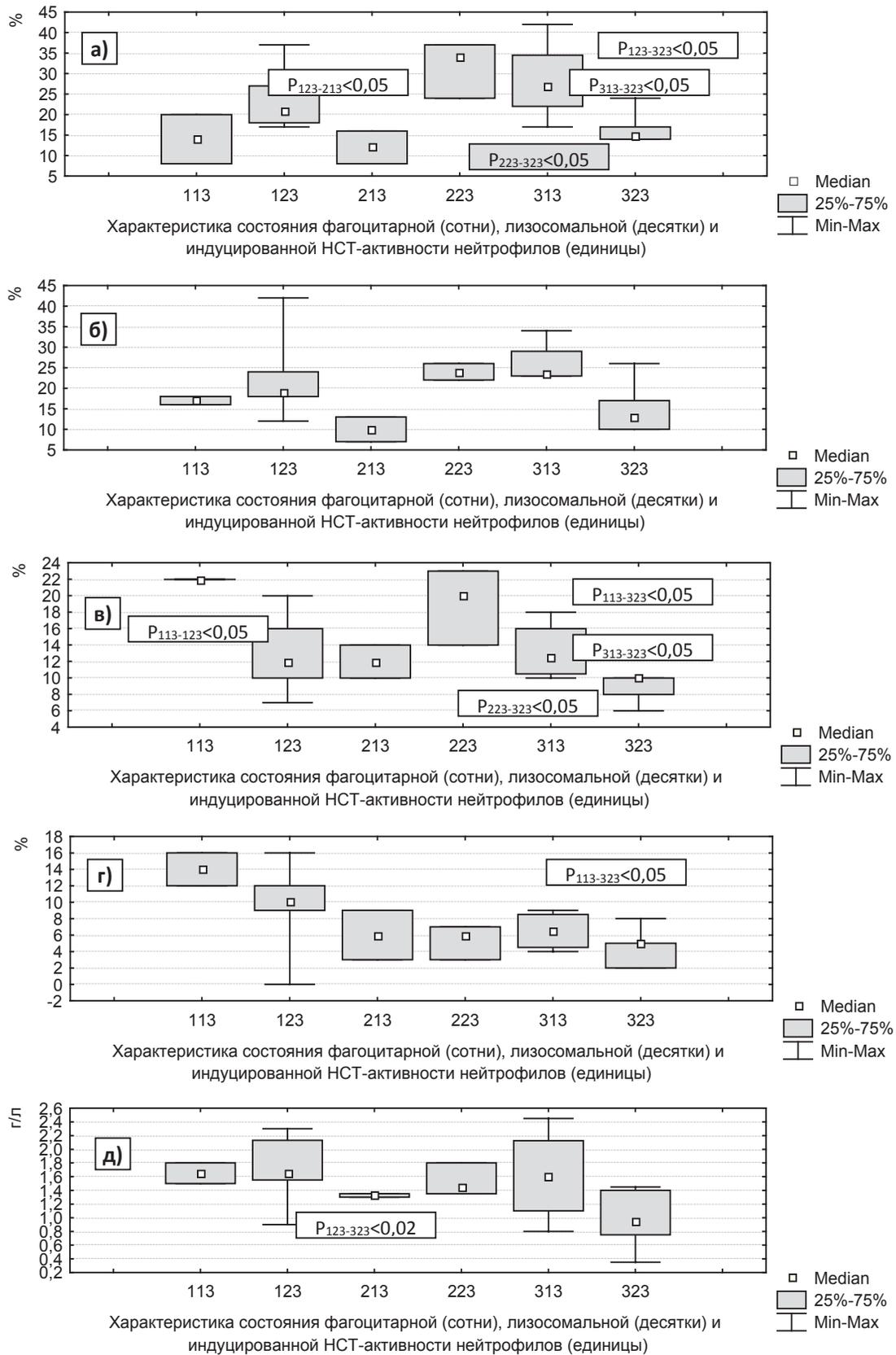
Доля обследованных борцов, лыжников и скороходов в составе 9 наиболее представительных состояний существенно не отличалась, тогда как относительное число наблюдений отдельных состояний в определенные сезоны значительно различалось.



**Рис. 1.** Содержание CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов (а) и IgG (б) у спортсменов при разных комбинациях низкого, среднего и высокого уровня фагоцитарной и лизосомальной активности Нф на фоне низких значений индуцированного НСТ-теста этих клеток.



**Рис. 2.** Содержание CD20<sup>+</sup>-лимфоцитов у спортсменов при различных комбинациях низкого, среднего и высокого уровня показателей фагоцитарной и лизосомальной активности Нф на фоне средних значений индуцированного НСТ-теста этих клеток.



**Рис. 3.** Содержание CD4<sup>+</sup> (а), CD8<sup>+</sup> (б), CD20<sup>+</sup> (в) и CD34<sup>+</sup>-лимфоцитов (г), а также IgA (д) у спортсменов при разных комбинациях уровня фагоцитарной и лизосомальной активности Нф на фоне высоких значений индуцированного НСТ-теста этих клеток.

Так, доля наблюдений у спортсменов состояния с низким уровнем фагоцитарной активности, низким или средним уровнем лизосомальной активности в сочетании с нормальным уровнем индуцированного НСТ-теста Нф зимой была значительно больше, чем осенью ( $P < 0,01$ ). Напротив, доля наблюдений у спортсменов состояния с высоким уровнем фагоцитарной активности, средним уровнем лизосомальной активности и индуцированного НСТ-теста Нф осенью была существенно больше, чем зимой ( $P < 0,02$ ). Летом доля наблюдений у спортсменов состояния с низким уровнем фагоцитарной активности, с высоким уровнем лизосомальной активности и средним уровнем индуцированного НСТ-теста Нф была значимо меньше, чем зимой ( $P < 0,05$ ). Несмотря на отсутствие значимых различий процентной доли представителей исследуемых видов спорта среди обследуемых 9 наиболее часто регистрируемых состояний комплексной диагностики эффекторных функций Нф, в отдельные периоды годового цикла отмечались существенные различия доли обследованных борцов, лыжников и ходоков с определенным сочетанием уровня фагоцитарной, лизосомальной и индуцированной НСТ-активности этих клеток. Так, зимой доля обследованных ходоков с нормальным уровнем лизосомальной и индуцированной НСТ-активности Нф при низком уровне индекса фагоцитоза этих клеток была существенно больше (38%), чем доля обследованных в этом сезоне борцов с аналогичным уровнем показателей состояния Нф (12%). Летом доля скороходов с сочетанием среднего уровня индекса фагоцитоза, индекса лизосомальной активности и индуцированного НСТ-теста Нф была значительно больше (25%), чем доля обследованных в этом сезоне лыжников с аналогичным сочетанием уровня показателей функционального состояния Нф (3,5%). Таким образом, ритм физических нагрузок в цикле года, свойственный процессу спортивной подготовки в различных видах двигательной деятельности, способен оказывать модулирующее влияние на проявление некоторых функциональных состояний Нф, определяемых комплексом показателей уровня фагоцитарной, лизосомальной и НСТ-активности этих клеток.

Далее мы провели анализ содержания некоторых субпопуляций CD-лимфоцитов, гормонов, цитокинов и гуморальных факторов иммунитета у спортсменов с различным сочетанием показателей фагоцитарной, лизосомаль-

ной и НСТ-активности Нф. На основании результатов непараметрического дисперсионного анализа множественного сравнения показателей иммунитета у 24 подгрупп спортсменов с разным состоянием Нф периферической крови, было установлено существенные вариации содержания CD4-, CD34-лимфоцитов и IgG в зависимости от сочетания низкого, среднего или высокого уровня фагоцитарной, лизосомальной и индуцированной НСТ-активности Нф.

Сравнение изучаемых показателей гуморального иммунитета и содержания CD-лимфоцитов у спортсменов в зависимости от вариации уровня двух показателей состояния Нф при относительно постоянном уровне третьего показателя позволило установить, что в выборке с низким уровнем индуцированного НСТ-теста у атлетов отмечались существенные межгрупповые различия ( $P < 0,05$ ) содержания IgG и CD25<sup>+</sup> в группах в зависимости от сочетания уровня фагоцитарной и лизосомальной активности этих клеток (**Рис. 1**). При этом в группе со средним уровнем фагоцитоза и низкой лизосомальной активностью (группа 211) содержание CD25<sup>+</sup> и IgG было значительно выше ( $P < 0,05$ ), чем в группе с низким уровнем фагоцитоза и средним уровнем лизосомальной активности (121), а также в группе с высоким уровнем фагоцитарной активности и средним уровнем лизосомальной активности Нф (321).

В группах с нормальным уровнем индуцированной НСТ-активности Нф комбинации разноуровневых показателей фагоцитарной и лизосомальной активности этих клеток обуславливали значимые межгрупповые различия по содержанию CD20<sup>+</sup>-лимфоцитов (**Рис. 2**), которые в группе с высоким уровнем лизосомальной активности и низким уровнем фагоцитоза (группа 132) были достоверно выше ( $P < 0,02$ ), чем в группе спортсменов с низкой фагоцитарной и лизосомальной активностью Нф (группа 112).

В выборочной совокупности спортсменов с высоким уровнем индуцированного НСТ-теста в зависимости от сочетания уровня фагоцитарной и лизосомальной активности Нф отмечались значимые межгрупповые различия ( $P < 0,05$ ) содержания IgA в крови, а также CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup> (**Рис. 3**). При этом в выборке с высоким уровнем фагоцитарной и индуцированной НСТ-активности Нф при нормальном уровне лизосомальной активности (323) содержание CD4<sup>+</sup> и CD20<sup>+</sup> было существенно ниже ( $P < 0,05$ ), чем в выборке с нормальным уровнем фагоцитарной

и лизосомальной активности (группа 223) и в выборке с совокупностью высокой фагоцитарной и низкой лизосомальной активностью (группа 313). При высоких значениях индуцированной НСТ-активности Нф в подгруппе с низким уровнем фагоцитарной и лизосомальной активности этих клеток (группа 113) уровень содержания CD34<sup>+</sup> был достоверно выше ( $P < 0,05$ ), чем в подгруппе с высоким уровнем фагоцитарной активности и нормальном уровне лизосомальной активности Нф (группа 323). Помимо того, при последнем состоянии Нф у обследуемых отмечалось существенное снижение IgA и CD4<sup>+</sup> ( $P < 0,02$  и  $P < 0,05$  – соответственно) в сравнении с группой спортсменов с низким уровнем фагоцитарной активности Нф (123).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, очевидно, что регулярные анаэробные и аэробные физические нагрузки в соответствии с особенностями их динамики в цикле года обуславливают модулирующее влияние в определенные сезоны года на состояние отдельных функций Нф и функциональное состояние этих клеток в целом. Комплексная оценка состояния Нф на основе трехуровневой шкалы характеристики фагоцитарной, лизосомальной и индуцированной НСТ-активности этих клеток выявила у обследованных спортсменов 24 из 27 возможных состояний, в составе 9 из наиболее представительных не выявлено существенных различий по величине доли обследованных борцов, лыжников и скороходов, но было установлено зимой значимое увеличение доли обследованных спортсменов с сочетанием низкой фагоцитарной активности с нормальным уровнем индуцированного НСТ-теста и средним или низким уровнем лизосомальной активности (группы 122 и 112 – соответственно) в сравнении с таковой осенью, а доли наблюдений с низкой фагоцитарной, средней индуцированной НСТ-теста и высокой лизосомальной активностью (группа 132) в сравнении с таковой летом ( $P < 0,05$ ). При этом осенью среди спортсменов отмечалось увеличение доли обследованных с высокой фагоцитарной активностью, средним уровнем лизосомальной и индуцированной НСТ-активности Нф (группа 322) в сравнении с таковой зимой.

Сравнение показателей содержания CD-лимфоцитов и гуморальных факторов иммунитета у групп спортсменов с различным сочетанием низкого, нормального и высокого уровня

фагоцитарной, лизосомальной и индуцированной НСТ-активности Нф по критерию Краскела-Уоллиса выявило достоверные межгрупповые различия по содержанию CD4<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> и Ig G. В ряду нормальных значений уровня индуцированной НСТ-активности Нф сочетание различных по уровню показателей фагоцитарной и лизосомальной активности этих клеток обуславливало существенные вариации уровня содержания CD20<sup>+</sup>-лимфоцитов. В группе с низким уровнем индуцированного НСТ-теста сочетание среднего уровня фагоцитоза с низким уровнем лизосомальной активности Нф (211) сопровождалось значительным увеличением содержания CD25<sup>+</sup> и IgG в сравнении с группой с нормальным уровнем лизосомальной активностью, но низким или высоким уровнем фагоцитарной активности Нф. В ряду высоких значений индуцированного НСТ-теста сочетание высокой фагоцитарной активности с нормальным уровнем лизосомальной активности Нф сопровождалось достоверно более низкими значениями содержания CD4<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> и IgA в периферической крови.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Черешнев В. А., Шмагель К. В. Иммунология. Москва, МАГИСТР-ПРЕСС, 2013, 448. [Chereshnev V. A., Shmagel C. V. Immunology. Moscow, MAGISTR-PRESS, 2013, 448.]
2. Колупаев В. А. Динамика фагоцитарной, лизосомальной и НСТ-активности нейтрофилов периферической крови у спортсменов по сезонам года. Вестник Российского университета дружбы народов. Серия Медицина 2008, 7, 276–281. [Kolupaev V. A. Dynamics of phagocytic, lysosomatic and nbt Activity of Neutrophiles and Monocytes in peripheral Blood of Sportsmen on Seasons. Bulletin of Peoples Friendship University of Russia. Series Medicine. 2008, 7, 276–281.]
3. Сашенков С. Л., Пылаева И. Л., Колупаев В. А., Долгушин И. И. Сезонные флуктуации клеточных и гуморальных факторов иммунитета у атлетов с разной динамикой физических нагрузок в цикле года. Гигиена и санитария 2012, 3, 42–44. [Sashenkov S. L., Pylaeva I. L., Kolupaev V. A., Dolgushin I. I. Seasonal fluctuations of cellular and humoral immunity factors in athletes with different dynamics of physical activity in the cycle of the year. Hygiene and sanitation 2012, 3, 42–44.]
4. Колупаев В. А., Сашенков С. Л., Долгушин И. И. Содержание CD-лимфоцитов в периферической крови квалифицированных спортсменов. Медицинская иммунология 2011, 13, 4–5, 469–470. [Kolupaev V. A., Sashenkov S. L., Dolgushin I. I. The Content of CD-lymphocytes in the peripheral blood of qualified athletes. Medical immunology 2011, 13, 4–5, 469–470.]

5. *Тотолян А. А., Фрейдлин И. С.* Клетки иммунной системы. СПб, Наука, 2000, 231. [*Totolyan A. A.,*

*Freidlin I. S.* Cells of the immune system.— SPb, Nauka, 2000, 231.]

## THE CONTENT OF CD-LYMPHOCYTES AND HUMORAL FACTORS IN ATHLETES WITH A DIFFERENT STATE OF PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS

© 2019 V. A. Kolupaev<sup>1\*</sup>, S. L. Sashenkov<sup>1</sup>, I. Y. Mel'nikov<sup>1</sup>,  
N. A. Lifanov<sup>1</sup>, I. L. Kolupaeva<sup>2</sup>

\*E-mail: vitalico@mail.ru

<sup>1</sup>South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia;

<sup>2</sup>Ural State University of Physical Culture, Chelyabinsk, Russia

Received: 22.05.2019. Accepted: 27.06.2019

The research is devoted to different rates of CD-lymphocytes and humoral factors in athletes. Athletes were divided into groups according to phagocytic, lysosomal and NBT-activity of neutrophils in peripheral blood. Also we took into account type of muscle energy supply (aerobic or anaerobic) and physical activity dynamics. It was determined that type of physical load has no significant effect on the studied parameters. At the same time, different combinations of the phagocytic and lysosomal activity rates accompanied by differences in CD20<sup>+</sup>-lymphocytes rate with normal level of NBT-test. At the low level of NBT-activity of neutrophils differences in CD20<sup>+</sup>-lymphocytes and IgG rates were noted. At the high level of NBT-activity of neutrophils significant differences in CD4, CD20, CD34 - lymphocytes and IgA rates were determined.

*Key words:* neutrophil phagocytic, lysosomal and NBT-activity, CD-lymphocytes, physical loads, cytokine

### Authors:

**Kolupaev V. A.**, ✉ Dr. Biol. Sciences, associate Professor, head of Physical Culture Department, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia;

454092, Chelyabinsk, Vorovskogo st., 64. South Ural State Medical University. Phone: +7 906 860 23 85, 8 (351) 261 25 96.

E-mail: vitalico@mail.ru

**Sashenkov S. L.**, MD, Professor, head of Normal Physiology Department, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia;

**Mel'nikov I. Y.**, PhD, associate professor of the Normal Physiology Department, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia;

**Lifanov N. A.**, senior lecturer of the Physical Culture Department, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia;

**Kolupaeva I. L.**, PhD, senior lecturer of the Department of Physical Rehabilitation and Sport Medicine, Ural State University of Physical Culture, Chelyabinsk, Russia.

## РОЛЬ ЦИТОКИНОВ В ХИРУРГИЧЕСКОМ СТРЕСС ОТВЕТЕ В РАННЕМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ У РИНОХИРУРГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

© 2019 г. А. М. Кorkмазов\*, Н. В. Корнова, А. С. Белошангин,  
А. М. Солтыс, А. А. Санюкович

\*E-mail: korkmazov09@gmail.com

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»,  
Челябинск, Россия

Поступила: 26.05.2019. Принята: 29.06.2019

В работе приведены результаты исследования содержания цитокинов в смывах со слизистой оболочки полости носа в ранний послеоперационный период у пациентов, прооперированных по поводу искривления носовой перегородки. Установлено, что у ринохирургических пациентов в первые сутки после хирургического вмешательства регистрируется дисбаланс в системе цитокинов, состоящий в повышении количества ИЛ-8, TNF- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-4, уменьшается содержание ИЛ-2, ИЛ-6. Полученные результаты мы расцениваем как результат компенсаторно-приспособительной реакции слизистой оболочки полости носа на хирургический стресс, возникающий в ранний послеоперационный период.

**Ключевые слова:** носовая перегородка, цитокины, иммунитет

DOI: 10.31857/S102872210007253-3

Адрес: Челябинск, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Кorkмазов Арсен Мусоссович. Тел.: +79193194604.

E-mail: korkmazov09@gmail.com

Авторы:

**Кorkмазов А. М.**, ассистент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия;

**Корнова Н. В.**, к.м.н., ассистент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия;

**Белошангин А. С.**, к.м.н., ассистент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия;

**Солтыс А. М.**, студентка 5 курса педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия;

**Санюкович А. А.**, студентка 5 курса педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Способы повышения эффективности оперативных вмешательств полости носа продолжает оставаться одной из проблем оториноларингологии ввиду сложности и недостаточной изученности механизмов пост-хирургического стресса, возникающего в ранний послеоперационный

период [1]. Судьба и специфика реабилитационного периода, длительность воспалительной реакции после хирургического вмешательства определяется состоянием барьерной системы слизистых оболочек [2]. Одним из пусковых факторов воспалительного процесса при хирургических вмешательствах является запуск цитокинового каскада, который включает, с одной стороны, провоспалительные цитокины, а с другой – противовоспалительные медиаторы, причём баланс между оппозитными группами цитокинов определяет характер течения и исход послеоперационного периода [3]. Имунная система слизистой оболочки полости носа представляет собой совокупность активно реагирующих на стрессовые воздействия клеток лимфоидного ряда слизистой оболочки, и клеточных факторов врожденного иммунитета, причём доказано, что популяции и субпопуляции лимфоцитов находятся в тесном взаимодействии с нейтрофильными гранулоцитами, макрофагальными и тучными клетками с помощью системы цитокинов [4]. В ответ на хирургическое вмешательство формируется ответная стресс реакция с участием медиаторов воспаления, при-

чем клиницисту важен не сам факт повышения или снижения их уровня, а их динамика и соотношение их оппозиционных пулов [5]. Одними из главных медиаторов развития местной воспалительной реакции на фоне хирургического вмешательства являются цитокины семейства ИЛ-1: ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , механизм действия которых заключается в регуляции воспалительных изменений, активации фагоцитов, фибробластов, тучных и эндотелиальных клеток [6]. Далее ИЛ-1 активирует местный и системный воспалительный каскад, призванный контролировать прогрессию тканевого повреждения, предупреждая бактериальную агрессию [5]. В реализации воспалительных постхирургических вмешательств важная роль отводится ФНО- $\alpha$ , поскольку после взаимодействия с мембранным рецептором Fas-семейства, ФНО- $\alpha$ , проявляет выраженное провоспалительное и катаболическое действие, стимулируя антимикробный потенциал фагоцитов, усиливая продукцию острофазовых белков, повышает функциональные способности эндотелия, способствует индукции экспрессии Fas-рецепторов на Т-лимфоцитах и высокоаффинного рецептора ИЛ-2, усиливая тем самым ИЛ-2-зависимый синтез ИФН- $\gamma$  [3]. Немаловажная роль в регуляции синтеза провоспалительных цитокинов принадлежит ИЛ-4, продуцируемому активированными Т-хелперами, тучными клетками и базофилами костного мозга [4]. При этом ИЛ-4 не только увеличивает противоопухолевую цитотоксичность макрофагов, но и способен, совместно с другими медиаторами, стимулировать продукцию С2 компонента системы комплемента [8].

Таким образом, цитокиновая сеть играет ключевую роль в стабилизации иммунных реакций слизистой оболочки при патологических состояниях, вызванных хирургическим вмешательством.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Период проведения исследования: январь – июль 2017 г. Для проведения исследования были отобраны 30 пациентов в возрасте 37,24 $\pm$ 3,29 лет от которых перед началом лечения было получено письменное добровольное информированное согласие на проведение оперативного вмешательства и участие в исследовании в соответствии с приказами МЗ РФ от 19.07.03 г. № 266; приказ Росздравнадзора от 17.10.06 г. № 2325-Пр/06 и прооперированных по поводу искривления носовой перегородки в ЛОР от-

делении Челябинской городской клинической больницы № 1. В качестве сравнения использованы показатели цитокинового профиля назального смыва, забранные до проведения оперативного вмешательства и через 24 часа после его завершения. Иммунологические исследования проведены в иммунологическом отделе НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ г. Челябинска (зав. отделом к.м.н. К. В. Никушкина) с использованием тест-систем «НПО Вектор» (Новосибирск, Россия): «Интерлейкин-1 $\beta$ -ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-1 $\alpha$ -ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-8-ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-ФНО- $\alpha$ -ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-2-ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-4-ИФА-БЕСТ». Исследование проводилось согласно методическим разработкам соответствующих тест-систем в диапазоне концентраций: для ИЛ-1 $\beta$  – 5–250 пг/мл, ФНО- $\alpha$  – 0–250 пг/мл, ИЛ-6 – 6–300 пг/мл, ИЛ-8 – 0–1000 пг/мл, ИЛ-10 – 5–250 пг/мл. Учет результатов производился по данным стандартной калибровочной кривой, с дальнейшим подсчетом концентрации цитокинов в пг/мл в исследуемых образцах. Для определения концентрации цитокинов до и после оперативного вмешательства были использованы бесклеточные фракции назальных смывов. Концентрацию цитокинов вычисляли методом перерасчета полученных результатов на 1 г белка, с учетом общего белка в объеме назального смыва, определяемого биуретовым методом.

Статистический анализ полученных данных проведен с использованием непараметрических критериев Мана-Уитни, при помощи пакета статистических программ SPSS «Statistics» версия 17.0. При проверке статистических гипотез о существовании различий показателей между группами критическим уровнем значимости ( $p$ ) был принят равным 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Учитывая множественность, а также синергизм и плеiotропность участвующих в воспалительных реакциях цитокинов, очевидно, что определение концентрации какого-то одного из них не будет адекватно отражать состояние цитокинового баланса назального смыва слизистых оболочек полости носа [8].

Содержание цитокинов в назальном смыве с поверхности слизистой оболочки носа до и после хирургического вмешательства представлено в **Таблице 1**.

**Таблица 1.** Содержание цитокинов в назальном смыве с поверхности слизистой оболочки носа у ринохирургических больных ( $M \pm m$ )

Содержание цитокинов	После операции	До операции
ИЛ-6, пг/мл	3,64±0,01*	11,4 ±0,01
ИЛ-10, пг/мл	6,8±0,03*	2,12± 0,03
ИЛ-1α, пг/мл	0,92±0,21*	1,65 ± 0,02
ФНО-α, пгм/л	1,12±0,02*	0,41 ± 0,02

**Примечание:** \* – статистически значимые отличия между показателями группы I к показателям группы II ( $p < 0,05$ ). При статистической обработке использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

После оперативного вмешательства зарегистрировано снижение концентрации ИЛ-6 в 3,2 раза по отношению к показателям до операции ( $p < 0,05$ ). Снижение концентрации ИЛ-6 в ранний послеоперационный период может быть следствием угнетения их продукции лимфоцитами вследствие уменьшения на поверхности полости носа после хирургического вмешательства. Концентрация ИЛ-10, наоборот, повысилась в 2,3 раза ( $p < 0,05$ ). По нашему мнению, повышенный уровень ИЛ-10 может быть результатом ответной реакции слизистой оболочки полости носа на хирургический стресс. Зарегистрированное повышение цитокинов семейства ИЛ-1 – «пускового» цитокина каскада иммунных реакций у ринохирургических больных является одним триггерных факторов реализации воспаления при хирургическом стрессе. При изучении содержания ИЛ-8 с поверхности слизистой оболочки полости носа после операции, было выявлено повышение его содержания 4,5 раза по сравнению с контрольными показателями. Повышение содержания ИЛ-8 может быть результатом оксидативного повреждения тканей.

Имеющиеся литературные данные позволяют выстроить следующую последовательность окислительных реакций при активации фагоцитирующих клеток в ходе хирургического стресса и выработке ими ИЛ-8. Стимулированный фагоцит продуцирует супероксиды, которые образуют  $H_2O_2$  из которых образуются более сильные окислители – гидроксил, гипохлорит и пероксинитрит, способные повреждать белки, липиды, клеточных мембран эпителиоцитов и иммуноцитов слизистой оболочки полости носа, усиление процессов липопероксидации приводит к появлению хемоаттрактантов, увеличивающих миграцию фагоцитов и выработке ими ИЛ-8.

В назальном смыве повышается содержание провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, TNF-α, ИЛ-8, что свидетельствует об активации эффекторов врожденного иммунитета и соответствует ранее полученным авторами результатам [5] и данным, продемонстрированным нами в процессе исследования, см. **Таблицу 1**. В назальных смывах повышается концентрация ИЛ-4, что свидетельствует о противовоспалительных эффектах, являющихся следствием стимуляции Th-2 типа иммунного ответа

## ОБСУЖДЕНИЕ

У пациентов с искривлением носовой перегородки в назальном смыве регистрируется снижение ИЛ-1β в 2,3 раза, ИЛ-6 в 3,2 раза, ФНО-α в 3,1 раза, повышение ИЛ-10 в 2,3 раза, ИЛ-8 в 4,5 раз. Выявленный дисбаланс продукции некоторых цитокинов способствует поддержанию воспаления слизистой оболочки полости носа. Через 24 часа после операции по поводу искривления носовой перегородки в назальном смыве повышается содержание провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, TNF-α, ИЛ-8, что свидетельствует о выраженной активации клеток, ответственных за синтез вышеперечисленных цитокинов. Полученные результаты мы расцениваем как результат компенсаторно-приспособительной реакции слизистой оболочки полости носа на хирургический стресс, возникающий в ранний послеоперационный период.

## ВЫВОД

У пациентов с искривлением носовой перегородки в назальном смыве регистрируется снижение ИЛ-1β в 2,3 раза, ИЛ-6 в 3,2 раза, ФНО-α в 3,1 раза, повышение ИЛ-10 в 2,3 раза, ИЛ-8 в 4,5 раз, что может рассматриваться как проявление постхирургической стресс-реакции.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Долгушин И. И., Андреева Ю. С., Мезенцева Е. А., Савочкина А. Ю., Плеханова Е. В., Свиридов М. А., Пешикова М. В. Нейтрофилы регулируют формирование микробиоценоза слизистых оболочек. Медицинская иммунология. 2006, (2–3), 8, 135–136. [Dolgushin I. I., Andreeva Yu. S., Mezentseva Ye. A., Savochkina A. Yu., Plekhanova Ye. V., Sviridov M. A., Peshikova M. V. Neutrophils regulate the formation of microbiocenosis of mucous membranes. Medical immunology. 2006, (2–3), 8, 135–136.]
2. Пешиков О. В. О строении маточной трубы. Морфология. 2019. 155 (1).— 73–77. [Peshikov O. V. On the structure of the fallopian tube / Morphology. 2019. 155.(1). 73–77]
3. Щетинин С. А., Гизингер О. А., Коркмазов А. М. Клинические проявления и дисфункции иммунного статуса у детей с хроническим рецидивирующим аденоидитом и методы их коррекции с использованием озонотерапии. Российский иммунологический журнал. 2015, 9 (3), 255–257. [Schetinin S. A., Gizinger O. A., Korkmazov A. M. Clinical manifestations and dysfunctions of the immune status in children with chronic recurrent adenoiditis and methods for their correction using ozone therapy. Russian immunological magazine. 2015, 9 (3), 255–257.]
4. Гизингер О. А., Ишпахтина К. Г., Колесников О. Л. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы периферической крови доноров в условиях эксперимента. Иммунология. 2009; 5: 263–267. [Gizinger O. A., Kolesnikov O. L., Ishpakhtina K. G. The influence of low-intensity laser radiation on neutrophils of donor peripheral blood under experimental conditions. Immunology. 2009; 5: 263–267].
5. Долгушин И. И., Гизингер О. А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы цервикального секрета у женщин с микоплазменной инфекцией. Вopr. курортологии, физиотерапии и лечеб. физкультуры. 2008. 4, 29–31. [Dolgushin I. I., Gisinger O. A. Effect of low-intensity laser radiation on cervical secretion neutrophils in women with mycoplasma infection. Vopr. balneology, physiotherapy and treatment. physical education. 2008. 4, 29–31.]
6. Гизингер О. А., Долгушин И. И. Система провоспалительных цитокинов у женщин с урогенитальным трихомониозом. Медицинская иммунология.—2005, 7, 5–6. 601–604. [Gisinger O. A., Dolgushin I. I., The system of proinflammatory cytokines in women with urogenital trichomoniasis. Medical immunology. 2005, 7, 5–6, 601–604.]
7. Гизингер О. А., Коркмазов А. М., Коркмазов М. Ю. Состояние факторов антимикробной защиты назального секрета у пациентов, оперированных по поводу искривления носовой перегородки в ранний послеоперационный период. Российский иммунологический журнал. 2017; 11(2): 117–119. [Gisinger O. A., Korkmazov A. M., Korkmazov M. Yu. The state of antimicrobial protection factors of nasal secretion in patients operated in patients operated on the curvature of the nasal septum in the early postoperative period. Russian immunological journal. 2017; 11(2): 117–119.]
8. Щетинин С. А., Гизингер О. А., Коркмазов М. Ю. Клинические проявления и дисфункции иммунного статуса у детей с хроническим рецидивирующим аденоидитом и методы их коррекции с использованием озонотерапии. Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9(18). 3–1. 255–257. [Schetinin S. A., Gizinger O. A., Korkmazov M. Yu. Clinical manifestations and dysfunctions of the immune status in children with chronic recurrent adenoiditis and methods for their correction using ozone therapy Russian immunological journal. 2015. Vol. 9 (18). 3–1. 255–257.]

## THE ROLE OF CYTOKINES IN A SURGICAL STRESS RESPONSE TO EARLY POSTOPERATIVE PERIOD IN RHINOSURGERY PATIENTS

© 2019 A. M. Korkmazov\*, N. V. Kornova, A. S. Beloshangin, A. M. Soltys, A. A. Sanyukovich

\*E-mail: korkmazov09@gmail.com

South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Received: 26.05.2019. Accepted: 29.06.2019

The paper presents the results of a study of the content of cytokines in washes from the mucous membrane of the nasal cavity in the early postoperative period in patients operated on for the curvature of the nasal septum. It has been established that in rhinosurgical patients on the first day after surgery, an imbalance in the cytokine system is recorded, consisting in increasing the amount of IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, and the content of IL-2 decreases. IL-6. We regard the results obtained as the result of the compensatory-adaptive response of the nasal mucosa to surgical stress that occurs in the early postoperative period.

*Key words:* nasal septum, cytokines, immunity

**Authors:**

**Korkmazov A. M.**, ✉ assistant, Department of Otorhinolaryngology, Federal State Budgetary Educational Institution “South Ural State Medical University”, Chelyabinsk, Russia;

Chelyabinsk, Federal State Budgetary Educational Institution “South Ural State Medical University”. Phone: +79193194604,

**E-mail:** korkmazov09@gmail.com

**Kornova N. V.**, PhD, Assistant Professor, Department of Otorhinolaryngology, Federal State Budgetary Educational Institution “South Ural State Medical University”, Chelyabinsk, Russia;

**Beloshangin A. S.** PhD, Assistant Professor, Department of Otorhinolaryngology, Federal State Budgetary Educational Institution “South Ural State Medical University”, Chelyabinsk, Russia;

**Sotys A. M.**, 5th year student of the Pediatric Faculty of the Federal State Budgetary Educational Institution “South Ural State Medical University”, Chelyabinsk, Russia;

**Sanyukovich A. A.**, 5th year student of the Pediatric Faculty of the Federal State Budgetary Educational Institution “South Ural State Medical University”, Chelyabinsk, Russia.

## ДОЗАЗАВИСИМОЕ ВЛИЯНИЕ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО ЭКСТРАКТА КЛЕТОК КУРИНОГО ЭМБРИОНА НА ИНДУЦИРОВАННЫЙ АПОПТОЗ МОНОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

© 2019 г. Е. Г. Костоломова<sup>1,2\*</sup>, Ю. Г. Суховой<sup>1</sup>, И. Г. Унгер<sup>1</sup>

\*E-mail: lenakost@mail.ru

<sup>1</sup>ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Тюмень, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет»

Минздрава РФ, Тюмень, Россия

Поступила: 25.05.2019. Принята: 30.06.2019

Одним из перспективных направлений является применение новых технологий, в частности разработка препаратов, обладающих способностью к нейтрализации и элиминации патогенных микроорганизмов, хорошо проникающих в рану и обладающих репаративными свойствами. Результаты исследований показали, что эмбриональные ткани кур имеют существенные перспективы для дальнейшего использования в качестве субстрата при получении различных форм эффективных биопрепаратов. Более глубокое изучение механизмов репаративной регенерации ран кожи, в частности роли апоптоза, может способствовать поиску новых подходов к терапии, связанной с воздействием на иммунные механизмы регуляции гибели клеток и оценке эффективности применяемых лекарственных препаратов.

**Ключевые слова:** клетки куриного эмбриона, апоптоз, моноциты, проточная цитометрия

DOI: 10.31857/S102872210007254-4

Адрес: Тюмень, ООО «Тюменский филиал ИКИ», Костоломова Елена Геннадьевна. Тел.: +79044930674.

E-mail: lenakost@mail.ru

Авторы:

**Костоломова Е. Г.**, к.б.н., ассистент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Тюмень, Россия; в.н.с. ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Тюмень, Россия;

**Суховой Ю. Г.**, д.м.н., профессор, директор ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Тюмень, Россия;

**Унгер И. Г.**, к.м.н., в.н.с. ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Тюмень, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день является бесспорным мнение, что любое ранозаживление — это комплекс мероприятий, направленных на все звенья патологического процесса [1]. Результаты исследований показали, что эмбриональные ткани кур имеют существенные перспективы для дальнейшего использования в качестве субстрата при получении различных форм эффективных биопрепаратов. При этом используются

методики как выделения клеточных субстанций, в частности стволовых клеток, так и получения различными способами биологически активных веществ. [2, 3].

Процессы заживления подчиняются тем же принципам, что и любая соединительная ткань в организме, которые регулируется через клеточно-клеточные и клеточно-матриксные сигналы и процессы пролиферации и апоптоза [4, 5, 6]. Если процесс апоптоза не возникает, то воспалительные процессы продолжают, поскольку из некротизированных клеток продолжают поступать провоспалительные факторы, такие как, например, лизосомальные протеолитические ферменты и метаболиты арахидоновой кислоты. Замедление же процессов апоптоза приводит к замене грануляционной ткани окончательной рубцовой тканью.

**Цель** — изучить влияние вещества, выделенного из экстракта клеток куриного эмбриона, на жизнеспособность и процессы апоптоза клеток в культуре, в зависимости от разных концентраций.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемое вещество получали по авторскому методу [7]. В качестве объекта исследования были выбраны клетки суспензионные культуры ТНР-1 (клетки моноцитарной лейкемии человека). Культивирование клеток линии ТНР-1 осуществляли с использованием среды RPMI-1640 («Биолот», Санкт-Петербург) с добавлением 10% инактивированной ЭТС («Биолот», Санкт-Петербург), 50 мкг/мл гентамицина («Биолот», Санкт-Петербург) и 2  $\mu$ M L-глутамина («Биолот», Санкт-Петербург). Пересев производили каждые 2–3 дня. Для ведения клеток использовали пластиковые флаконы объемом 50 мл («Sarstedt», Германия). Клетки инкубировали при 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. При постановке экспериментов в лунки 96-луночного плоскодонного планшета («Sarstedt», Германия) вносили 200 мкл клеточной суспензии (2 $\times$ 10<sup>6</sup> клеток в мл) в соответствующей полной культуральной среде. В качестве индуктора апоптоза использовали камптотедин, цитотоксический хинолиновый алкалоид, ингибирующий топоизомеразу I, ядерный фермент, участвующий в процессе репликации ДНК. Камптотедин ковалентно связывается с топоизомеразой I и ДНК, образуя тройной комплекс. Это предотвращает лигирование ДНК и является причиной повреждения ДНК, ведущее к апоптозу клетки. Токсичность камптотедина обуславливается результатом преобразования одностранных разрывов ДНК в двустранные во время S-фазы, когда вилка репликации сталкивается с расщеплением комплексов, образованных между камптотедином и ДНК. В ходе собственных экспериментов были использованы финальные концентрации 1 и 0,2  $\mu$ M. Вещество интереса вносили в финальных концентрациях 10, 100 и 300 мкг/мл. Также инкубацию клеток осуществляли в присутствии обоих стимуляторов. Время инкубации в присутствии стимуляторов составляло 24 часа 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

Оценку жизнеспособности клеток проводили при помощи проточной цитофлуориметрии. Для оценки относительного содержания клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза, применяли два флуоресцентных красителя PI и YO-PRO-1 по описанное ранее методике [8]. При окраске клеток к 100 мкл клеточной суспензии (2–3 $\times$ 10<sup>6</sup> клеток/мл) добавляли раствор YO-PRO-1 («Invitrogen», США) в финальной концентрации 250 нМ и раствор йодистого пропидия («Sigma-Aldrich», США) в финальной

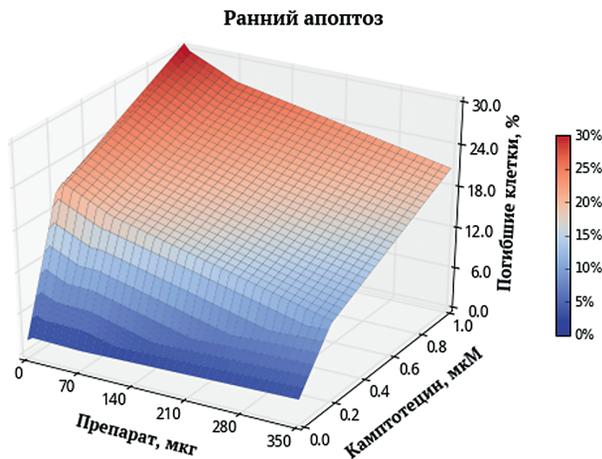
концентрации 1 мкг/мл. Окраску проводили при комнатной температуре в течение 15 минут в защищенном от света месте. По завершении инкубации к образцам добавляли по 200 мкл ЗФР и анализировали на проточном цитофлуориметре Navios™ («Beckman Coulter», США). Для каждого из образцов анализировали не менее 20000 одиночных клеток. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США).

## МАТРИЧНЫЙ АНАЛИЗ

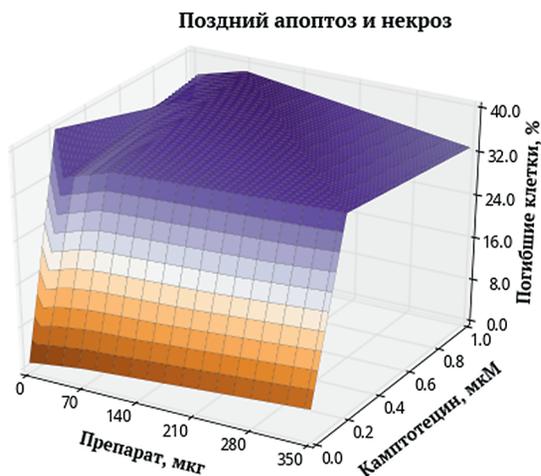
Концентрации камптотедина и вещества, использованные в экспериментах, обозначим через множества:  $X=\{x_1, x_2, \dots, x_n\}$ ,  $X \in \mathbb{R}$  и  $Y=\{y_1, y_2, \dots, y_n\}$ ,  $Y \in \mathbb{R}$ , соответственно. Каждой паре значений  $(x_i; y_i)$  соответствуют процентные значения величины гибели клеток на ранней стадии от апоптоза ( $z_i$ ) и на поздней стадии от апоптоза и некроза ( $z'_i$ ). Таким образом, мы получаем две матрицы, в которой вектор-строки  $(x_i; y_i; z_i)$  и  $(x_i; y_i; z'_i)$  определяют точки, лежащие на двух поверхностях в трехмерном пространстве. Полученные данные в виде двумерного массива обрабатывались с помощью языка программирования Python (Python Software Foundation, <http://www.python.org>) и модулей SciPy и Numpy. На первом этапе проводилось формирование узлов двумерной сетки с помощью функции `numpy.meshgrid` [9], а затем данные интерполировались с помощью функции `scipy.interpolate.griddata` [10]. Графическое построение поверхностей выполнялось с помощью модуля Matplotlib. Также статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США). Результаты выражали в виде % позитивных клеток. Сравнение относительного содержания клеток на различных стадиях апоптоза между экспериментами проводили при помощи t-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольных образцах клеток линии ТНР-1 относительно содержание живых клеток составляло 96,53 $\pm$ 0,46%. Внесение вещества в финальной концентрации 300 мкг/мл сопровождалось достоверным снижением ( $p < 0,001$ ) относительного содержания жизнеспособных клеток до 91,72 $\pm$ 0,44%. Более того, отмечено достоверное увеличение относительного содержания клеток, находящихся на ранних стадиях апоптоза.



**Рисунок 1.** Поверхность, характеризующая зависимость ранней апоптотической гибели клеток от концентраций веществ. Градиентная заливка поверхности позволяет оценивать отдельное и комбинированное действие препарата и камптотецина. Синим цветом обозначены области с низким процентом гибели клеток, а красным – области с высоким процентом гибели.



**Рисунок 2.** Поверхность, характеризующая зависимость поздней гибели клеток в результате апоптоза и некроза от концентраций веществ. Коричневым цветом обозначены области с низким процентом гибели клеток, а фиолетовым – области с высоким процентом гибели.

тоза ( $3,16 \pm 0,19\%$  против  $1,99 \pm 0,39\%$  в контроле,  $p=0,024$ ), а также погибших клеток (поздний апоптоз/некроз), когда результаты контрольных образцов были превышены более чем в 4 раза ( $5,12 \pm 0,28\%$  и  $1,47 \pm 0,21\%$ , соответственно, при  $p < 0,001$ ). Что касается серии экспериментов, в рамках которых вещество применяется в фи-

нальной концентрации 100 мкг/мл, то было отмечено достоверное двукратное увеличение ( $p=0,009$ ) клеток, находящихся на терминальных стадиях апоптоза и в некрозе ( $2,69 \pm 0,29\%$ ). Препарат в финальной концентрации 10 мкг/мл не оказывал достоверное влияние ни на один из исследованных показателей (**Рисунки 1 и 2.**)

Внесение в среду для культивирования камптотецина, индуктора апоптоза, в финальной концентрации 1 мМ сопровождалось снижением ( $p < 0,001$ ) относительного содержания жизнеспособных клеток до  $31,58 \pm 1,68\%$ , а также увеличением относительного содержания клеток на ранних и поздних стадиях апоптоза (до  $30,12 \pm 1,94\%$  и  $38,30\%$ , соответственно). Вместе с тем, в присутствие препарата в финальной концентрации 300 мкг/мл уровень жизнеспособных клеток увеличивался ( $p=0,001$ ) и достигал значений в  $45,11 \pm 2,17\%$ . Более того, относительное содержание ТНР-1, находящихся на ранних стадия апоптоза снижалось до  $21,49 \pm 2,15\%$  ( $p=0,018$ ), а клеток, находящихся на стадии позднего апоптоза и некроза – до  $33,40 \pm 2,49\%$  ( $p=0,165$ ). Внесение препарата в концентрациях 100 и 10 мкг/мл не оказывало достоверного влияния на распределение клеток по фазам апоптоза (**Рисунки 1 и 2.**)

В рамках отдельного эксперимента концентрация камптотецина в клетки была понижена до 0,2 мМ, что привело к увеличению относительного содержания живых клеток до  $47,76 \pm 3,17\%$ , тогда как на ранних и поздних стадиях апоптоза находилось уже  $20,75 \pm 2,40\%$  и  $31,49 \pm 1,31\%$  клеток, соответственно. Инкубация ТНР-1 в присутствие камптотецина и препарата в финальной концентрации 300 мкг/мл достоверно не влияла на жизнеспособность клеток ( $51,11 \pm 1,49\%$ ,  $p=0,367$ ), однако сопровождалась почти двукратным снижением относительного содержания клеток, находящихся на ранних стадиях апоптоза (до  $12,86 \pm 2,00$  при  $p=0,036$ ). По остальным концентрациям препарата достоверных изменений жизнеспособности клеток линии ТНР-1 отмечено не было.

## ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований были получены данные о дозозависимом влиянии исследуемого вещества на жизнеспособность и процессы апоптоза клеток в культуре. Таким образом исследуемое вещество возможно обладает не только антибактериальными и противовоспалительными, но и регуляторными свой-

ствами, способствующими эффективному выживанию клеток в периферических тканях при воспалительных реакциях. Поскольку обладает выраженной способностью блокировать индуцированный апоптоз моноцитов, что, возможно, способствует продлению жизни моноцитов в условиях воспаления и более успешному противостоянию микробным факторам, ускоряющим апоптоз клеток, а значит более эффективно элиминировать чужеродную генетическую информацию и поврежденные ткани организма.

Более глубокое изучение механизмов репаративной регенерации ран кожи, в частности роли апоптоза, может способствовать поиску новых подходов к терапии, связанной с воздействием на иммунные механизмы регуляции гибели клеток и оценке эффективности применяемых лекарственных препаратов для профилактики образования рубцов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Gericke J., Ittensohn J., Mihály J., Alvarez S., Alvarez R., Töröcsik D., de Lera A. R., Rühl R. Regulation of Retinoid Mediated Signaling Involved in Skin Homeostasis by RAR and RXR Agonists / Antagonists in Mouse Skin // PLoS One. 2013 Apr 24; 8(4): e62643.
2. Костоломова Е. Г., Суховой Ю. Г., Унгер И. Г., Акунеева Т. В. Взаимодействие иммуноцитов кожи в процессе репаративной регенерации в ране. Российский иммунологический журнал. 2017. Т. 11(20). № 2. С. 148–150. [Kostolomova E. G., Sukhovey Y. G., Unger I. G., Akuneeva T. V. The interaction of immune cells of the skin in the process of reparative regeneration in the wound. Russian journal of immunology 2017, 11 (20), № 2. С. 148–150.]
3. Суховой Ю. Г., Костоломова Е. Г., Цирятьева С. Б., Аргунова Г. А., Унгер И. Г., Гольцов С. В. Регенераторно-репаративные и антибактериальные свойства препарата «Cellgel» в эксперименте. Российский Иммунологический Журнал, 2015, том 9(18), № 2(1). с 44–46. [Sukhovey Y. G., Kostolomova E. G., Tsiryayeva S. B., Argunova G. A., Unger I. G., Goltsov S. V. Regenerative-reparative and antibacterial properties of the drug “Cellgel” in the experiment. Russian journal of immunology 2015, том nine (18), № 2 (1). с 44–46.]
4. Костоломова Е. Г., Стрелин С. А., Суховой Ю. Г., Унгер И. Г., Акунеева Т. В. Роль процессов пролиферации и апоптоза в образовании рубцовой ткани. Медицинская иммунология. 2017. Т. 19. № S. С. 327. [Kostolomova E. G., Strelin S. A., Sukhovey Y. G., Unger I. G., Akuneeva T. V. The role of the processes of proliferation and apoptosis in the formation of scar tissue. Medical immunology. 2017. Т. 19. № S. С. 327.]
5. Fuchs Y, Brown S, Gorenc T, Rodriguez J, Fuchs E, Steller H. Sept4/ARTS Regulates Stem Cell Apoptosis and Skin Regeneration. Science. 2013 Jun 20.
6. Костоломова Е. Г., Суховой Ю. Г., Гольцов С. В., Унгер И. Г., Акунеева Т. В. Некоторые иммунофизиологические механизмы регенерации ран в условиях применения ранозаживляющего средства “CELLGEL”. Российский Иммунологический Журнал, 2016, том 10(19), № 3. с 289–291. [Kostolomova E. G., Sukhovey Y. G., Unger I. G., Goltsov S. V., Akuneeva T. V. Certain immunophysiological mechanisms of wound repair in condition of wound healing medical means “cellgel” application. Russian journal of immunology 2016, 10 (19), № 3. С. 289–291.]
7. Суховой Ю. Г., Унгер И. Г., Костоломова Е. Г., Гольцов С. В. патент на изобретение RUS2481115 13.10.2011 средство для заживления ран “целлгель”, способ его получения и способ лечения ран различной этиологии полученным средством.
8. Надеев А. Д., Кудрявцев И. В., Серебрякова М. К., Авдонин П. В., Зинченко В. П., Гончаров Н. В. Индукция апоптоза и некроза клеток эндотелия пупочной вены человека пероксидом водорода. Цитология. 2015, 57, 12, 909–916. [A. D. Nadeev, I. V. Kudryavtsev, M. K. Serebriakova, P. V. Avdonin, V. P. Zinchenko, N. V. Goncharov. Dual Proapoptotic and Pronecrotic Effect of Hydrogen Peroxide on Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Cell and Tissue Biology. 2016, 10(2), 145–151].
9. Tallarida R. J. Drug synergism and dose-effect data analysis / R. J. Tallarida. – CRC Press, 2000. – 264 p.
10. Khuri A. I., Mukhopadhyay S. Response surface methodology / A. I. Khuri, S. Mukhopadhyay. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics. – 2010. – Т. 2. – № . 2. – С. 128–149.

**DEPENDABLE EFFECT OF LYOPHYLIZED EXTRACT OF CHICKEN  
EMBRYO CELLS ON INDUCED APOPTOSIS OF MONOCYTES UNDER  
IN VITRO CONDITIONS**

© 2019 E.G. Kostolomova<sup>1,2\*</sup>, U. G. Suhovej<sup>1</sup>, I. G. Unger<sup>1</sup>

\*E-mail: lenakost@mail.ru

<sup>1</sup>«Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology», Tyumen, Russia;

<sup>2</sup>FSBEI of Higher Education «Tyumen State Medical University» of the Ministry of Healthcare  
of Russian Federation, Tyumen, Russia

**Received:** 25.05.2019. **Accepted:** 30.06.2019

One of the promising areas is the use of new technologies, in particular the development of drugs that have the ability to neutralize and eliminate pathogenic microorganisms that penetrate well into the wound and have reparative properties. The research results showed that the embryonic tissues of chickens have significant prospects for further use as a substrate in the preparation of various forms of effective biologics. A more in-depth study of the mechanisms of reparative regeneration of skin wounds, in particular the role of apoptosis, can facilitate the search for new approaches to therapy associated with effects on immune mechanisms regulating cell death and assessing the effectiveness of the drugs used.

*Key words:* chicken embryo cells, apoptosis, monocytes, flow cytometry

**Authors:**

**Kostolomova E. G.**, ✉ PhD (Biology), the assistant to faculty of pathological physiology FSBEI of Higher Education «Tyumen State Medical University» of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Tyumen, Russia; leading research associate «Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology», Tyumen, Russia.

625027, Tyumen, st. Kotovsky, 5. Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology, Phone: +79044930674,

**E-mail:** lenakost@mail.ru;

**Suhovej J. G.**, MD (Medicine), Professor, Director «Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology», Tyumen, Russia;

**Unger I. G.**, PhD (Medicine), leading research associate «Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology», Tyumen, Russia.

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ РАННЕЙ ФОРМЫ ПЕРИИМПЛАНТИТА И ВЛИЯНИЕ ТОПИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ НА САЛИВАТОРНЫЙ УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ДЕНТАЛЬНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ

© 2019 г. Л. С. Латышина\*, А. В. Пиотрович, Л. Ю. Мальшева,  
Т. В. Артюхевич, Е. В. Кузьмина

\*E-mail: [Latyushinal@mail.ru](mailto:Latyushinal@mail.ru)

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия

Поступила: 19.05.2019. Принята: 27.06.2019

В настоящее время для замещения отсутствующих зубов широко применяется протезирование с опорой на дентальные имплантаты и, соответственно, растет число осложнений, связанных с возникновением воспаления окружающих тканей – периимплантитом. Цель работы – провести анализ уровня цитокинов полости рта у пациентов при проведении закрытого синус-лифтинга с одномоментной дентальной имплантацией, завершившейся развитием ранней формы периимплантита, и оценить влияние топической иммунотерапии на концентрацию цитокинов слюны при данном методе имплантации. 105 пациентов, получивших имплантологическое лечение, были комплексно обследованы с использованием лабораторных и иммунологических методов – оценивали динамику концентраций IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-8, IL-2 и IL-10 слюны на 6-е, 12-е и 24-е сутки послеоперационного периода. На основании анализа саливакторного уровня цитокинов у пациентов с ранней формой периимплантита был выявлен дисбаланс системы про- и противовоспалительных цитокинов ротовой полости. Топическая цитокинотерапия беталейкином и ронколейкином нивелировала обнаруженные иммунологические изменения и способствовала предотвращению хронизации воспалительной реакции в раннем послеоперационном периоде.

**Ключевые слова:** цитокины, ранний периимплантит дентальная имплантация, топическая иммунотерапия, беталейкин, ронколейкин

DOI: 10.31857/S102872210007255-5

Адрес: Челябинск, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Латышина Лариса Сергеевна. Тел.: +79048166773. E-mail: [Latyushinal@mail.ru](mailto:Latyushinal@mail.ru)

### Авторы:

**Латышина Л. С.**, д.м.н., доцент, заведующий кафедрой Хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

**Пиотрович А. В.**, к.м.н., доцент кафедры Хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

**Мальшева Л. Ю.**, к.м.н., доцент кафедры Хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

**Артюхевич Т. В.**, ассистент кафедры Хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

**Кузьмина Е. В.**, ассистент кафедры Хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для замещения отсутствующих зубов широко применяется протезирование с опорой на дентальные имплантаты. Однако, с количественным ростом установленных имплантатов, увеличивается и процентное соотношение осложнений, связанных с возникновением воспаления окружающих тканей – периимплантитом [1]. Известно, что периимплантит в раннем послеоперационном периоде возникает как следствие воспалительного поражения инфекционной природы, которое может быть связано, в том числе, с близким расположением имплантата к очагу периапикального поражения. В результате контаминации поверхности имплантата может происходить утрата костной

ткани в его апикальной или средней части [1]. Исход – потеря дентального имплантата, формирование функциональных и структурных нарушений [2]. Число подобных ранних осложнений варьирует в пределах от 3 до 10% [3]. Даже строгое соблюдение всех рекомендаций по показаниям и противопоказаниям для проведения дентальной имплантации, усовершенствование её хирургической техники не всегда гарантирует удовлетворительный результат лечения.

Данные о распространенности раннего периимплантита малочисленны, встречаются единичные публикации отечественных и зарубежных авторов по теоретическому обоснованию единой системы прогнозирования исходов дентальной имплантации. В частности, имеются работы по исследованию физических показателей биологических сред организма человека с целью возможности прогнозирования заболеваний, в том числе осложнений дентальной имплантации [4]. В ряде исследований приводятся сведения о возможном прогнозе осложнений дентальной имплантации за счет разработки объективных скрининговых методов ранней диагностики, основанных на выявлении количественно-качественного уровня продуктов свободнорадикального окисления [5]. Тем не менее, публикаций, определяющих роль и выявляющих особенности иммунологической составляющей в развитии ранней формы периимплантита не обнаружено.

Одной из наиболее сложной клинической ситуацией, связанной с высокой вероятностью развития инфекционно-воспалительных осложнений, является установка одиночного имплантата методикой закрытого синус-лифтинга в дистальных отделах верхней челюсти. Исход лечения при данном оперативном вмешательстве во многом зависит от особенностей иммунологической резистентности верхнечелюстного синуса и полости рта. Известно, что содержание цитокинов в биологических жидкостях свидетельствует о выраженности эффективности воспалительного ответа [6].

Указанные предпосылки определили **цель работы** – провести анализ уровня цитокинов полости рта у пациентов при проведении закрытого синус-лифтинга с одномоментной дентальной имплантацией, завершившейся развитием ранней формы периимплантита, и оценить влияние топической иммунотерапии на концентрацию цитокинов слюны при данном методе имплантации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на клинической базе кафедры Хирургической стоматологии и ЧЛХ и в НИИ иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России – 105 пациентов, получивших имплантологическое лечение (установка дентального имплантата в дистальных отделах верхней челюсти с дополнительной манипуляцией закрытый синус-лифтинг), были комплексно обследованы с использованием лабораторных и иммунологических методов. Средний возраст больных составил 43 [37; 49] года, среди обследуемых было 74 женщины (70%) и 31 мужчина (30%). Диагноз определялся в соответствии с МКБ-10 (1997) – К 08.1. Проводимое исследование характеризовалось двухкомпонентным дизайном. На первом этапе проводилось изучение и ретроспективный сравнительный анализ саливаторного уровня цитокинов у 35 пациентов (мужчины – n=10 (29%), женщины – n=25 (71%), средний возраст 43 [37; 49] года). У 29 обследуемых из этой группы был положительный исход лечения (1-я подгруппа), во 2-й подгруппе (n=6) было зарегистрировано развитие раннего периимплантита, и, как следствие, – потеря имплантата. В рамках второго этапа проводилось краткосрочное, проспективное, сравнительное, «простое слепое» рандомизированное исследование по оценке эффективности локального применения рекомбинантных цитокинов IL-1β (беталейкин – регистрационное удостоверение № Р N000222/01 от 20.12.2007, производитель ФГУП «ГНИИ Особо чистых биопрепаратов», СПб., Россия, гидрогелевый «Колетекс-Бета» – ТУ 9393-018-58223785-2011, производитель ООО «Колетекс», Москва, Россия) и IL-2 (ронколейкин – регистрационный номер ЛС-001810-270711, «Биотех», СПб., Россия), по разработанным в ходе исследования схемам (патент № 2600867 РФ на изобретение). Методом простой рандомизации было сформировано три, сопоставимых по гендерным и возрастным признакам, группы: две основные – группа «Беталейкин» (ГБ), (n = 35) и группа «Ронколейкин» (ГР), (n = 35) – пациентам которых на фоне оперативного вмешательства проводилась топическая цитокинотерапия, а также группа сравнения (ГС), (n = 35), в которой были установлены имплантаты по общепринятой методике без применения иммунопрепаратов.

Концентрацию цитокинов (IL-1β, IL-1-RA, IL-8, IL-2, IL-10) в нестимулированной сме-

шанной слюне определяли методом ИФА (тест системы ООО «Цитокин», СПб, РФ). Слюна забиралась до начала операции, затем на 6-е, 12-е, 24-е сутки послеоперационного периода. Результаты расчета получали в пкг/мл и сравнивались с показателями контрольной группы (КГ) – 10 клинически здоровых людей, сопоставимых по полу и возрасту с пациентами. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных компьютерных программ SPSS Statistics 17,0, используя критерии Манна-Уитни, Крускала-Уоллиса, при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При оценке полученных на первом этапе работы данных был выявлен ряд статистиче-

ски значимых различий между показателями здоровых лиц, пациентов с положительным исходом хирургического этапа имплантологического лечения и с больными, у которых установленный дентальный имплантат был утрачен в результате ранней формы периимплантита (Таблица 1). В динамике у всех пациентов обеих подгрупп было определено статистически значимое с контролем повышение уровней всех изучаемых медиаторов. Наиболее выраженное увеличение концентрации IL-1 $\beta$  было отмечено в подгруппе пациентов с неблагоприятным исходом хирургического лечения: на 6-е сутки 8,5 раз в сравнении с показателями контроля; на 12-е сутки – семикратное превосходство. В то же время в первой подгруппе увеличение показателей IL-1 $\beta$  в сравнении с клинически здоровыми лицами составили на 6-е сутки 6,5 раз,

**Таблица 1.** Показатели концентрации цитокинов смешанной слюны у пациентов с различным исходом закрытого синус-лифтинга с одномоментной дентальной имплантацией

Цитокины (пкг/мл)	Сроки (сутки)	1) 1-я подгруппа (n= 29)	2) 2-я подгруппа (n= 6)	3) группа контроля (n=10)
IL-1 $\beta$	д/о	43 [9;75]	40 [26;75]	32 [15;58]
	6-е	208 [169; 276]*	272 [264;364]*	
	12-е	189 [151; 281]*	230 [109;276]*	
	24-е	208 [169; 276]*	209 [149;371]*	
IL-1-RA	д/о	669 [160; 958]	691 [234; 958]	579 [430; 1025]
	6-е	2045 [1156; 3575]*	2115 [1275; 2727]*	
	12-е	1585 [1309; 1735]*	1594 [1169; 2437]*	
	24-е	2256 [1169; 3000]*	2598 [1320; 2609]*	
IL-8	д/о	303 [262; 333]	269 [265; 308]	304 [261;423]
	6-е	1152 [1126; 1406]* **	1673 [1486; 2141]*	
	12-е	392 [304; 405]	449 [333; 1169]	
	24-е	1054 [889; 1258]*	1160 [963; 1554]*	
IL-10	д/о	21 [17; 33]	32 [19; 42]	24 [13;34]
	6-е	51 [41; 68] *	86 [58; 130]*	
	12-е	34 [19; 39]	33 [18; 55]	
	24-е	21 [19; 28]	16 [12; 32]	
IL-2	д/о	10 [8; 11]	12 [10; 17]	10 [9; 12]
	6-е	21 [18; 24]*	23 [19; 26]*	
	12-е	13 [12; 15]	12 [10; 17]	
	24-е	16 [10; 21]	16 [12; 28]	

**Примечание:** \*Статистически значимые различия между группами пациентов с группой контроля ( $p \leq 0,05$ ); \*\* Статистически значимые различия между группами пациентов ( $p \leq 0,05$ ).

а на 12 -е — до 5,7 раз. На 24-е сутки во второй подгруппе пациентов сохранялось увеличение показателя (до 6,5 раз в сравнении с данными здоровых лиц), а в первой подгруппе был отмечен повторный рост концентрации медиатора.

Нарастание уровня IL-1-RA на 6-е сутки также было выраженное во второй подгруппе обследуемых — разрыв составил 3,7 раза (первая подгруппа — 3,5). К 12-му дню в обеих подгруппах уровень антагониста IL-1 $\beta$  незначительно снижался, к последним срокам исследования концентрация IL-1-RA опять нарастала — синхронно с увеличением продукции IL-1 $\beta$  в первой подгруппе пациентов и на фоне снижения уровня IL-1 $\beta$  во второй.

Анализ содержания IL-8 слюны показал статистически значимое в сравнении с контролем его увеличение, которое было более выражено в подгруппе пациентов с неблагоприятным исходом имплантации — на 6-е сутки разрыв с контролем составил 5,5 раза и статистически отличался от показателя концентрации исследуемого медиатора в первой подгруппе. На 12-е сутки в обеих подгруппах было зафиксировано снижение уровня хемоаттрактанта, но к 24-м — уровень IL-8 опять нарастал, более выраженно во второй подгруппе пациентов.

На 6-й день обследования определялся высокий уровень IL-2 у пациентов второй подгруппы (в 2,3 раз относительно контрольных значений), но в последующие сроки наблюдения его концентрация восстанавливалась. К 24-м суткам значения медиатора вновь повысилось в обеих группах, но опять же статистически значимое во второй подгруппе исследуемых пациентов. Оценка динамики концентрации IL-10 показала достоверно более значимое его увеличение к 6-м суткам у пациентов второй подгруппы (в 3,6 раз в сравнении с контролем, в 2,1 раз в сравнении с первой подгруппой), снижение до первоначальных цифр в обеих подгруппах пациентов было зарегистрировано к 24-му дню наблюдения.

На втором этапе изучалось влияние топической цитокинотерапии на уровни изучаемых цитокинов слюны. Ко второму сроку исследования были выявлены повышенные концентрации IL-1 $\beta$ , его ингибитора IL-1Ra и хемокина IL-8 у всех обследуемых, но наибольшие значения в группе получавших терапию беталейкином ( $p=0,00...$  с показателями ГР, ГС, КГ). На 12-е сутки наблюдения отмечено снижение содержания вышеуказанных медиаторов во всех группах

пациентов. К 24-му дню исследования у пациентов основных групп была зарегистрирована нормализация уровней IL-1 $\beta$  и его антагониста, при этом концентрация основного хемоаттрактанта восстановилась только у пациентов группы «Ронколейкин», в то же время у пациентов, пролеченных беталейкином, продолжалось его снижение, в группе сравнения был отмечен новый скачок роста.

На 6-й день послеоперационного периода было зарегистрировано повышение концентрации IL-2, слюны у пациентов всех групп, наиболее выраженное у пациентов, получавших терапию ронколейкином ( $p=0,00$  с ГС, КГ), но уже к 12-м суткам было отмечено снижение его концентрации и к 24-му дню лечения только в группе сравнения сохранялись статистически значимые отличия с ГБ и ГР ( $p=0,00...$ ), а также в КГ (0,0008). Профиль противовоспалительного IL-10 характеризовался подъемом концентрации у всех 105 пациентов ко второму сроку обследования и нормализацией к 24-м суткам в ГР и ГС (на фоне роста уровня флоготенных цитокинов у пациентов группы сравнения), при сохранении высоких концентраций у больных, получавших местное лечение беталейкином ( $p=0,04$  с КГ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования в ходе изучения цитокинового профиля слюны у пациентов с различным исходом имплантологического лечения были определены иммунологические признаки хронизации послеоперационной воспалительной реакции у всех обследуемых, в значительно более выраженном варианте — у пациентов с ранней формой периимплантита. Выявленные особенности выражались преимущественно в дисбалансе про- и противовоспалительной системы и на это указывают, прежде всего, особенности динамики уровня IL-1 $\beta$  и IL-1-RA — значительное повышение их концентрации на протяжении всего послеоперационного периода [7]. Обращает на себя внимание тот факт, что к концу исследования определялся рост уровня IL-8, в большей степени, у пациентов с неблагоприятным исходом хирургического лечения. Учитывая, что IL-8 является мощным хемоаттрактантом, можно предположить, что до 24-го дня исследования сохранялся послеоперационный воспалительный процесс, вероятно, связанный с повторной контаминацией. В пользу данного тезиса свидетельствует рост продук-

ции IL-2 к финальным срокам обследования. Также формирующуюся хронизацию воспалительной реакции в послеоперационном периоде косвенно подтверждает динамика уровня IL-10, соотношенная с показателями других цитокинов, а именно, отсутствие увеличения его концентрации (у пациентов с ранней формой периимплантита) на фоне нарастания показателей флогогенных медиаторов. Таким образом, на первом этапе работы были выявлены некоторые иммунологические предпосылки для развития раннего периимплантита и определены пути топической профилактики данного осложнения, приводящего к потере имплантата – местная цитокинотерапия, направленная на нормализацию локальной иммунологической составляющей.

На втором этапе исследования определяли влияние локальной иммунокоррекции беталейкином и ронколейкином на уровень цитокинов слюны у пациентов, которым проводилась установка дентальных имплантатов. Было определено различное действие препаратов на концентрацию изучаемых цитокинов, но обнаружен общий интегральный эффект, заключающийся в нивелировании обнаруженного ранее дисбаланса системы про- и противовоспалительных цитокинов и, соответственно, в предупреждении хронизации воспалительной послеоперационной реакции.

## ВЫВОДЫ

1. У пациентов с ранней формой периимплантита, пролеченных с применением дентальных имплантатов (установленных методом закрытого синус-лифтинга), на основании анализа слюваторного уровня цитокинов выявлены особенности иммунологических показателей – дисбаланс системы про- и противовоспалительных цитокинов ротовой полости.

2. Топическая цитокинотерапия беталейкином и ронколейкином способствует нивелированию изменений системы про- и противовоспалительных цитокинов, нормализуя их концентрации и, соответственно, предотвращает развитие хронизации воспалительной реакции в раннем послеоперационном периоде.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Кристианстад С. Р., Джованьоли Ж. Л.*, «Периимплантит». Азбука. Москва, Санкт-Петербург, Киев, Алматы, Вильнюс, 2014, 255. [*Kristianstad S. R., Giovagnoli J. L.*, Periimplats. ABC. Moscow, St. Petersburg, Kiev, Almaty, Vilnius, 2014, 255].
2. *Плюхин Д. В., Цейликман В. Э., Цейликман О. Б., Сеницкий А. И.* Особенности свободнорадикального окисления липидов и белков плазмы крови при дентальной имплантации и периимплантите. Казанский медицинский журнал 2015, 96,5, 756–759. [*Plyukhin D. V., Tseylikman O. B., Sinititskiy A. I.* Features of free radical lipid peroxidation and serum proteins at dental implants and peri-implantitis. Kazan medical magazine 2015, 96,5, 756–759].
3. *Михальченко Д. В., Яковлев А. Т., Бадрак Е. Ю.* Проблема воспаления в периимплантатных тканях и факторы, влияющие на его течение (обзор литературы) / Волгоградский научно-медицинский журнал. 2015, 4, 15–18. [*Mikhailchenko D. V., Yakovlev A. T., Badrak E. Yu.* The problem of inflammation in the periimplant tissues and the factors influencing its course (literature review) / Volgograd Medical Scientific Journal. 2015, 4, 15–18.]
4. *Походенько-Чудакова И. О., Карасюк Ю. В.* Прогнозирование осложнений дентальной имплантации по физическим показателям биологических сред организма человека на современном этапе. Вятский медицинский вестник 2018, 57,1, 76–82. [*Pokhodenko-Chudakova I. O., Karasyuk Yu. V.* Prediction of complications dental implantation according to physical indicators of biological media the human body at the present stage. Vyatka Medical Herald 2018, 57.1, 76–82.]
5. *Асташина Н. Б., Плюхин Д. В., Делец А. В.* Прогнозирование исходов дентальной имплантации на основе изучения уровня продуктов окислительной модификации белков слюны. Екатеринбург Проблемы стоматологии 2017, 13,3, 47–52. [*Astaschina N. B., Pluchin D. V., Delets A. V.* Forecasting outcomes of dental implantation on the basis of studying the level of products of oxidative modification of saliva proteins. The problems of dentistry, 2017, 13, 3, 47–52.]
6. *Вавилова Т. П., Янушевич Т. П., Островская И. Г.* Слюна. Аналитические возможности и перспективы. Москва, БИНОМ, 2014, 312. [*Vavilova T. P., Yanushevich T. P., Ostrovskaya I. G.* Saliva. Analytical capabilities and prospects. Moscow, BINOM, 2014, 312.]
7. *Москалёв А. В., Сбойчаков В. Б., Рудой А. С.* Общая иммунология с основами клинической иммунологии. ГЭОТАР-Медиа, Москва, 2015, 352. [*Moskalyov A. V., Sboychakov V. B., Rudoi A. S.* General Immunology with Fundamentals of Clinical Immunology. GEOTAR-Media, Moscow, 2015. 352. Russian.]

**IMMUNOLOGICAL FEATURES OF THE DEVELOPMENT EARLY  
FORM PERIIMPLANTS AND THE TOPICAL IMMUNOTHERAPY EFFECT  
ON THE SALIVATOR LEVEL CYTOKINES DURING DENTAL IMPLANTATION**

© 2019 **L. S. Latyushina\***, **A. V. Piotrovich**, **L. J. Malysheva**,  
**T. V. Artyukhevich**, **E. V. Kuzmina**

\*E-mail: [Latyushinal@mail.ru](mailto:Latyushinal@mail.ru)

*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education South Ural State Medical  
University” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia*

**Received:** 19.05.2019. **Accepted:** 27.06.2019

Currently, prosthetics based on dental implants is widely used for the replacement of missing teeth, and consequently the number of complications associated with the occurrence of inflammation surrounding tissues is growing. The object of the research is to conduct analysis the level oral cytokines in the patients with a closed sinus lift with simultaneous dental implantation, ending in the development of early form of periimplants, and to assess the topical immunotherapy effect on concentration saliva cytokines in this implantation method. 105 patients who received implant treatment were comprehensively examined using laboratory and immunological methods – the dynamics of concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-8, IL-2 and IL-10 of saliva on the 6th, 12th and 24 th day of the postoperative period was evaluated. Based on the analysis of the salivator level of cytokine in patients with early periimplants the imbalance of the pro- and anti-inflammatory cytokines of the oral cavity was diagnosed. The topical cytokine therapy with betaleukin and roncoleukin leveled out the revealed immunological changes and prevented the chronic inflammatory response in the early postoperative period.

*Key words:* dental implantation, closed sinus lift, bone losses periimplants zone, topical immunotherapy, betaleukin, roncoleukin

**Authors:**

**Latyushina L. S.**, ✉ MD, Associate Professor, Head of the Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery, FGBOU VO South Ural State Medical University of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia.

Chelyabinsk, FGBOU VO “South Ural State Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation.  
Phone: +79048166773, **E-mail:** [Latyushinal@mail.ru](mailto:Latyushinal@mail.ru);

**Piotrovich A. V.**, MD, Associate Professor of the Department of Surgical Dentistry and Oral and Maxillofacial Surgery, FGBOU VO South Ural State Medical University of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

**Malysheva L. Yu.**, MD, Associate Professor of the Department of Surgical Dentistry and Oral and Maxillofacial Surgery, FGBOU VO South Ural State Medical University of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

**Artyukhevich T. V.**, assistant professor of the Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery, FGBOU VO South Ural State Medical University of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

**Kuzmina E. V.**, assistant professor of the Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery, FGBOU VO South Ural State Medical University of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia.

## ПСИХОНЕЙРОИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ОРИГИНАЛЬНОГО АНТИКОНВУЛЬСАНТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛКОГОЛИЗМЕ

© 2019 г. **Е. В. Маркова<sup>1,2\*</sup>, И. В. Савкин<sup>1</sup>, М. А. Княжева<sup>1</sup>,  
Т. В. Шушпанова<sup>3</sup>, Т. П. Новожеева<sup>3</sup>**

*\*E-mail: evgeniya\_markova@mail.ru*

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной  
и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный педагогический университет», Новосибирск, Россия;

<sup>3</sup>«Научно-исследовательский институт психического здоровья» Томского национального  
исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, Россия

Поступила: 16.05.2019. Принята: 23.06.2019

Существенным звеном в патогенезе алкогольной зависимости является нарушение механизмов нейроиммунного взаимодействия, что обуславливает перспективность поиска новых эффективных и безопасных фармакологических средств коррекции, действующих на молекулярные мишени влияния алкоголя в ЦНС и способных корригировать нейроиммунную дисрегуляцию. Продемонстрирован позитивный психонейроиммуномодулирующий эффект при экспериментальной алкогольной зависимости оригинального антиконвульсанта, обладающего модулирующим действием на ГАМКА/бензодиазепиновый рецепторный комплекс. Эффект выражался в снижении патологического влечения к алкоголю, стимуляции параметров ориентировочно-исследовательского поведения и иммунного ответа, что обуславливает перспективность применения антиконвульсанта в терапии хронического алкоголизма и может обеспечить новый фармакотерапевтический подход к профилактике и лечению данного заболевания.

**Ключевые слова:** алкоголизм, антиконвульсант, поведение, иммунный ответ

DOI: 10.31857/S102872210007256-6

Адрес: 630099. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14, ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», лаборатория нейроиммунологии. Маркова Евгения Валерьевна. Тел./факс: +7(383) 222-06-72, +79039346786.

E-mail: evgeniya\_markova@mail.ru

**Авторы:**

**Маркова Е. В.**, д.м.н., заведующая лабораторией нейроиммунологии, главный научный сотрудник ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии»; профессор ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный педагогический университет», Новосибирск, Россия;

**Савкин И. В.**, научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «НИИ Фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

**Княжева М. А.**, аспирант лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «НИИ Фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

**Шушпанова Т. В.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической психонейроиммунологии и нейробиологии, «Научно-исследовательский институт психического здоровья» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, Россия;

**Новожеева Т. П.**, д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической психонейроиммунологии и нейробиологии, «Научно-исследовательский институт психического здоровья» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук» Российской академии наук, Томск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Проблема потребления психоактивных веществ (ПАВ) и зависимости от них в последние десятилетия превратилась в мировую медико-социальную проблему, которая демонстрирует тенденцию неуклонного роста; потребление ПАВ, в частности алкоголя, приводит к значительному увеличению числа больных алкоголизмом и росту числа связанных с этим соматических заболеваний. Существенным звеном в патогенезе болезней зависимости является нарушение механизмов нейроиммунного взаимодействия, характеризующееся дисбалансом

нейромедиаторов и нейромодуляторов в центральной нервной системе, усиленной продукцией аутоантител к нейромедиаторам, нарушении центральной и периферической продукции цитокинов [1, 2, 3, 4].

Одной из ведущих проблем в лечении алкоголизма является необходимость формирования новых подходов к профилактике и лечению этого заболевания. Перспективным является поиск новых эффективных и безопасных фармакологических средств коррекции, действующих на молекулярные мишени влияния алкоголя в ЦНС и способных корригировать нейроиммунную дисрегуляцию, препятствуя тем самым развитию алкогольной интоксикации и зависимости. Мишенями действия алкоголя в центральной нервной системе (ЦНС) являются ГАМКА-рецепторы (ГАМКА-Р), представляющие основную ингибиторную нейротрансмиттерную систему в ЦНС, и играющие центральную роль в опосредовании эффектов этанола [5, 6, 7]. Хроническое употребление алкоголя вызывает также нейроадаптивные изменения бензодиазепиновых рецепторов (БДР), модулирующих ГАМКА-Р, что поддерживает аддиктивное состояние [8, 9].

В последние десятилетия активно развивается «эпилептогенная концепция» возникновения неконтролируемого влечения к ПАВ, предполагающая общность патогенетических механизмов эпилептических пароксизмов и нейрофункциональной патологической доминанты, обуславливающей компульсивное влечение к ПАВ [10]. Указанная концепция служит основанием использования антиконвульсантов в наркологической практике. Модулирующее действие на БДР показано для оригинального соединения мета-хлоро-бензгидрилмочевины (м-хБГМ), синтезированного в Проблемной научно-исследовательской лаборатории синтеза лекарственных средств Томского политехнического университета в процессе поиска высокоэффективных антиконвульсантов [11]. В отличие от большинства аналогов, соединение является действующим веществом, не требующим трансформации в печени, что значительно снижает токсичность и исключает побочные эффекты (сонливость, гепато- и нейротоксические эффекты), что предполагает перспективность его применения в терапии алкоголизма и обуславливает целесообразность исследования влияния данного соединения на психофизиологические показатели животных с алкогольной зависимостью.

**Целью** данного исследования было изучение влияния оригинального антиконвульсанта м-хБГМ на параметры поведения и иммунитета у животных в состоянии экспериментального алкоголизма.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на мышах-самцах (СВА х С57В1/6) F1 (n = 80), полученных из лаборатории экспериментальных животных НИИФФМ (г. Новосибирск). Животных содержали в условиях лабораторного вивария в клетках по 10 особей в каждой, на стандартной диете, при нормальном световом режиме. Содержание экспериментальных животных соответствовало правилам, принятым Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986) и правилами лабораторной практики (приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003, N267).

Ориентировочно-исследовательское поведение (ОИП) животных оценивали в тесте «открытое поле» [12]. Для этого использовалась большая прямоугольная камера (100 × 100 см) с пластмассовыми стенками высотой 40 см. Поллом служил лист белого пластика, на который черной краской нанесена решётка, делящая поле на 100 (10 × 10) равных квадратов. Освещение проводилось бестеневой лампой мощностью 100 Вт, расположенной на высоте 100 см над центром поля. Животное помещалось в угол камеры и регистрировалась его моторная и исследовательская активность в течение 5 минут с интервалом в 1 минуту. Для каждого животного подсчитывалось число пересеченных центральных и периферических квадратов, число вертикальных стоек (свободных и с опорой на стенку поля), суммарная горизонтальная и вертикальная двигательная активность. С целью определения степени эмоциональной реактивности регистрировалось число фекальных болюсов. Все эксперименты проводились в период времени с 10 до 14 часов.

Хроническая зависимость от этанола была сформирована у двух групп мышей-самцов (СВАхС57В1/6) F1 с активным и пассивным типами ОИП путем принудительной алкоголизации (10% раствор этанола в качестве единственного источника жидкости) в течение 6 месяцев с регулярным замером потребляемого количества раствора этанола. Животные в состоянии экспериментальной алкогольной зависимости про-

водилось курсовое (10 дней) внутрижелудочное введение оригинального соединения м-хБГМ в виде суспензии на 1% крахмальной слизи в действующей концентрации 11,6 мг/кг в сутки в условиях свободного выбора между 10% раствором этанола и водой в течение 10 суток (двух-бутылочный оральный тест) с ежедневным замером потребления жидкостей каждым животным.

Для оценки интенсивности основных звеньев иммунного ответа мышей иммунизировали посредством внутрибрюшинного введения эритроцитов барана (5% – 0,5 мл.). Гуморальный иммунный ответ оценивали на пятые сутки после иммунизации по количеству локальных зон гемолиза в полужидкой среде. Определение количества антителообразующих клеток в селезенке. (АОК) проводилось модифицированным методом А. J. Cunningham [13]. Для определения высоты реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) через 96 часов после иммунизации внутрибрюшинным введением эритроцитов барана (0,5% – 0,5 мл.), вводили разрешающую дозу указанного антигена (50% – 0,05 мл.) под апоневроз задней стопы. Формирование реакции ГЗТ оценивали через 24 часа после разрешающей инъекции по степени опухания лапы (изменения её толщины по сравнению с позитивно-контрольной задней лапой того же животного, в которую была введена среда RPMI 1640). Индекс реакции (ИР) определяли для каждой мыши по формуле  $ИР = (P_0 - P_k) / P_k$  и выражали в процентах [14].

Статистическая обработка результатов проводилась с применением парного критерия Манна-

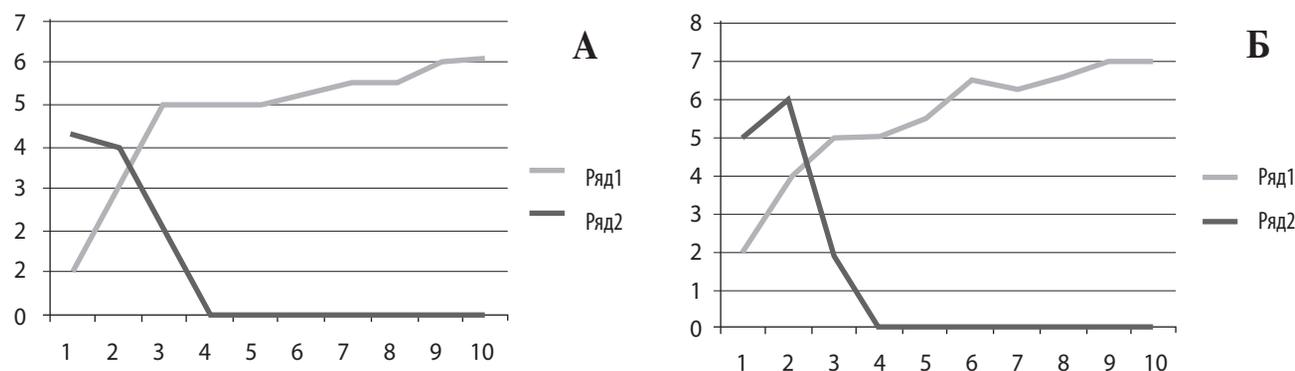
Уитни (компьютерная программа STATISTICA 10.0 for Windows, StatSoft, USA). Данные представлены в виде  $M \pm SD$ . Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Хроническая зависимость от этанола была сформирована у двух групп мышей (СВАхС57В1/6) F1 с активным и пассивным типами ОИП, поскольку ранее нами была показана различная чувствительность указанных групп животных к ПАВ [4, 15, 16]. Показано, что животные с пассивным типом поведения, начиная с первых дней спаивания, потребляли большее количество алкоголя, чем мыши с оппозиционным типом поведения: среднесуточное потребление 10% раствора этанола (мл/мышь) животными указанных групп составило  $1,9 \pm 0,65$  и  $2,5 \pm 0,5$  соответственно ( $p < 0,05$ ).

На фоне приема м-хБГМ у всех мышей в состоянии хронического алкоголизма, независимо от типа поведения, регистрировалось снижение количества потребляемого раствора этанола и повышение потребления воды в условиях свободного выбора; после 4 дней приема м-хБГМ мыши отказались от приема алкоголя (Рис. 1).

Представленные результаты свидетельствуют о том, что указанный оригинальный антиконвульсант при экспериментальной алкогольной зависимости обладает выраженным эффектом, направленным на снижение патологического влечения к алкоголю, и обуславливают целесообразность исследования его влияния на функ-



**Рис. 1.** Суточное потребление 10% раствора этанола и воды (мл / мышь) при условии свободного выбора мышами (СВА х С57В1/6) F1 с активным (А) и пассивным (Б) типами поведения в состоянии алкоголизма на фоне курсового введения оригинального антиконвульсанта мета-хлоро-бензгидрилмочевины

**Примечание:** по оси абсцисс – дни введения препарата; по оси ординат – количество потребленной жидкости (мл); ряд 1 – количество потребляемого этанола; ряд 2 – количество потребляемой воды;  $n = 24-28$  в каждой группе животных.

циональную активность основных гомеостатических систем организма нервной и иммунной.

Поисковая активность важна как фактор регулирования психического и соматического здоровья. Хроническая алкогольная интоксикация приводит, как известно, к формированию депрессивно-подобного поведения [2, 3], в силу чего, представляло определенный интерес оценить параметры ОИП у мышей с оппозитными типами поведения в состоянии хронического алкоголизма после курсового приема оригинального антиконвульсанта, снижающего патологическое влечение к этанолу. При исследовании параметров ОИП животных-алкоголиков после курсового приема м-хБГМ зарегистрировано существенное повышение показателей суммарной горизонтальной двигательной активности (моторный компонент поведения), наиболее выраженное у мышей с пассивным типом поведения (в 2.7 раза у активных и в 5.2 раза у пассивных мышей); причём, стимуляция центральной горизонтальной двигательной активности наблюдалась только у мышей с активным типом поведения. При анализе показателей вертикальной двигательной активности, отражающей исследовательский компонент поведения, установлен значительный стимулирующий эффект м-хБГМ (в 9.6 раза отмечено повышение суммарной вертикальной активности у мышей с исходно активным типом поведения и в 6,5 раз у животных с пассивным типом поведения). При этом у мышей с пассивным типом поведения после приема соединения отмечалось появление не свойственных этим животным свободных стоек. Обращает на себя внимание тот факт, что после приема м-хБГМ, большинство параметров поведения животных-алкоголиков были даже выше, чем таковые у интактных животных аналогичного возраста (контрольная группа) и соответствовали параметрам поведения в «открытом поле», характерным для молодых 3-х месячных животных.

Анализ показателей интенсивности основных звеньев иммунного ответа выявил после курсового приема м-хБГМ стимуляцию гуморального иммунного ответа, оцененного по относительному числу АОК селезенки; причём, также наблюдались индивидуально-типологические особенности реагирования животных в состоянии хронического алкоголизма на оригинальный антиконвульсант: эффект был наиболее выражен у животных с активным типом ОИП по сравнению с мышами с пассивным типом поведения.

После приема оригинального антиконвульсанта у всех мышей регистрируется также существенное повышение уровня развиваемой реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) в ответ на введение Т-зависимого антигена. Стимулирующий клеточное звено иммунного ответа при хронической алкогольной интоксикации эффект м-хБГМ наиболее выражен у животных с пассивным типом ОИП (в 2 раза сильнее, чем в оппозитной группе).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Злоупотребление алкоголем вызывает развитие толерантности и зависимости, посредством взаимодействия этанола с ГАМКА/бензодиазепиновым рецепторным комплексом (ГАМКА/БДР) в различных структурах головного мозга [5, 7, 9]. Наряду с изменением в метаболических и рецепторных системах мозга, нарушение нейроиммунного взаимодействия, иммуносупрессия, играют важную роль в патогенезе аддиктивных расстройств, в частности, алкоголизма [10]. Перспективы лечения алкогольной зависимости связаны с использованием новых препаратов, оказывающих модулирующее действие на молекулярные мишени действия этанола в ЦНС. В этой связи, применение противосудорожных препаратов, влияющих на ГАМКА/БД рецепторную систему, стимулирующих ГАМК-медиацию, проявляющих анксиолитические свойства без выраженного седативного эффекта, не формирующих зависимость и синдром отмены при их использовании, может обеспечить новый фармакотерапевтический подход к профилактике и лечению этого заболевания.

Будучи одним из главных нейромедиаторов, ГАМК в относительно высокой концентрации обнаружена в головном мозге. Установлено ее присутствие также в других органах и тканях [17, 18], в частности, описано наличие функциональных ГАМК рецепторов на поверхности Т-лимфоцитов [19, 20]. Нейроиммунотенная активность ГАМК-ергической системы опосредована ГАМКА-Р изменение активности которых, аналогично эффектам на нейрональных клетках, вызывает модуляцию функциональной активности клеток иммунной системы, изменяя их пролиферативную активность в периферической крови и в костном мозге дозозависимым образом [21, 22]. Посредством ГАМКА-Р показана также модуляция интенсивности развития реакции ГЗТ [21]. Бензодиазепины, связываясь со специфическими местами на ГАМКА-Р

комплексе – бензодиазепиновыми рецепторами (БДР), изменяют его конформацию и аффинитет, аллостерически модулируя его функцию, потенцируя процессы торможения в структурах мозга, влияющих на активность разных нейромедиаторных систем [23, 24]. Ранее нами было установлено, что м-хБГМ, повышает нейромедиацию ГАМК и модулирует ГАМКА/БДР [9, 25, 26], Показанное в настоящем исследовании влияние данного оригинального соединения на алкогольную мотивацию, поведение в «открытом поле» и интенсивность гуморального и клеточного иммунного ответа у экспериментальных животных с оппозитными (активным и пассивным) типами поведения свидетельствует о позитивном психо-нейроиммуномодулирующем эффекте м-хБГМ при экспериментальной алкогольной зависимости, выражающемся в снижении патологического влечения к алкоголю, стимуляции параметров ориентировочно-исследовательского поведения и иммунного ответа. Вышеизложенное обуславливает перспективность применения указанного оригинального антиконвульсанта в терапии хронического алкоголизма. Продемонстрированные особенности корригирующего поведенческие и иммунные показатели эффекта соединения м-хБГМ при экспериментальном алкоголизме, равно как и выявленные индивидуально-типологические особенности реагирования особей с оппозитными типами поведения на его воздействие, послужат экспериментальным обоснованием дифференцированного использования инновационного антиконвульсанта в терапии алкогольной зависимости с позиций персонализированной медицины.

Работа выполнена по теме из Плана НИР НИИФКИ, № гос. Регистрации 01201356998.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Крыжановский Г. Н., Асмаев И. Г., Магаев С. В., Морозов С. Г. Нейроиммуноэндокринные взаимодействия в норме и патологии. М.: Медицинская книга. 2010, 288. [Kryzhanovsky G. N., Asmaev I. G., Magayev S. V., Morozov S. G. Neuroimmunoendocrine interactions in norm and pathology. M.: Meditsinskaya kniga. 2010, 288].
2. Cui C., Grandison L., Noronha A. Neuroimmune mechanisms of brain function and alcohol related disorders. *Brain, Behavior, and Immunity* 2011, 25, 1–3.
3. Kelleys K. W., R. Dantzer. Alcoholism and inflammation: Neuroimmunology of behavioral and mood disorders. *Brain, Behavior, and Immunity* 2011, 25 (1), 13–20.
4. Чухрова М. Г., Дресвянников В. Л., Маркова Е. В. Наркотическая зависимость: современные стратегии исследования. Saint-Louis, Missouri, USA. 2015. [Chukhrova M. G., Dresvannikov V. L., Markova E. V. Drug dependence: modern research strategies. Saint Louis, Missouri, USA. 2015].
5. Centanni S. W., Teppen T., Risher M. L., Fleming R. L., Moss J. L., Acheson S. K., et al. Adolescent alcohol exposure alters GABAA receptor subunit expression in adult hippocampus. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2014, 38, 2800–2808.
6. Follesa P., Floris G., Asuni G. et al. Chronic Intermittent Ethanol Regulates Hippocampal GABA(A) Receptor Delta Subunit Gene Expression. *Front. Cell. Neurosci.* 2015, 9, 445.
7. Follesa P., Biggio F., Caria S., Gorini G., Biggio G. Modulation of GABA(A) receptor gene expression by allopregnanolone and ethanol. *Eur. J. Pharmacol.* 2004, 500, 413–425.
8. Collingridge G. L., Isaac J. T., Wang Y. T. Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nature Reviews. Neuroscience.* 2004, 5, 952–962.
9. Shushpanova T. V., Bokhan N. A., Lebedeva Y. F., Solonskii A. V., Uduv V. V. The effect of chronic alcohol abuses on the benzodiazepine receptor system in various areas of the human brain. *African J Psychiatry* 2016, 19 (3), 1000365 doi: 10.4172/2378–5756.1000365
10. Анохина И. Л. Основные биологические механизмы зависимости от психоактивных веществ. Наркология: национальное руководство / под ред. Н. Н. Иванца, И. Л. Анохиной, М. А. Винниковой. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2008. [Anokhina I. L. The main biological mechanisms of dependence on psychoactive substances. *Narcology: national leadership* / ed. N. N. Ivance, I. L. Anokhinoy, M. A. Vinnikova. Moscow: GEOTAR-Media. 2008].
11. Novozheeva T., Markova E., Shushpanova O., Knyazeva E., Shushpanova T. Optimizing pharmacotherapy of epilepsy by creating new ways of administering of original anticonvulsant meta-chlorobenzhydryl urea (m-CLBHU). *European psychiatry* 2019, 56, S15.
12. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М; 1991. 399. [Buresh Ya., Bureshova O., Houston D. P. Techniques and basic experiments on the study of the brain and behavior. M; 1991, 399].
13. Cunningham A. J. A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells. *Nature* 1965, 207, 1106–1107.
14. Yoshikai Y., Miake S., Matsumoto T., et al. Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed footpad reaction to SRBC in mice. *Immunol.* 1979, 38, 3, 577–583.
15. Гольдина И. А., Маркова Е. В., Гольдин Б. Г., Княжева М. А., Гайдюль К. В. Протекторные свойства экстракта куркумы при этанолиндуцированных нарушениях поведения Саратовский научно-медицинский журнал 2017, 13, 1, 131–135. [Goldina I. A., Markova E. V., Goldin B. G., Knyazheva M. A., Gaydul K. V. Protecting properties of turmeric extract for ethanol-induced behavioral disorders. *Saratov Journal of Medical Scientific Research* 2017, 13, 1, 131–135].
16. Маркова Е. В. Иммунная система и высшая нервная деятельность. Механизмы нейроиммунных

- взаимодействий в реализации и регуляции поведенческих реакций. Saarbruken. 2012. [Markova E. V. The immune system and higher nervous activity. Mechanisms of neuroimmune interactions in the realization and regulation of behavioral reactions. Saarbruken. 2012].
17. Cavalotti D., Artico M., D'Andrea V., Cavalotti C. GABA-transaminase activity in the human thymus after administration of interferons. *Hum. Immunol.* 2000, 61, 697–704.
  18. Geigerseder C., Doepner R., Thalhammer A., Frungieri M. B., Gamer-Dimelon K., Calandra R. S., Kohn F. M., Maverhofer A. Evidence for a GABAergic system in rodent and human testis; local GABA production and GABA receptors. *Neuroendocrinology* 2003, 77, 314–28.
  19. Alam S., Laughton D. L., Walding A., Wolstenholme A. J. Human peripheral blood mononuclear cells express GABAA receptor subunits. *Mol Immunol.* 2006, 43, 9, 1432–1442.
  20. Mendu S. K., Akesson L., Jin Z., et al. Increased GABAA channel subunits expression in CD8<sup>+</sup> but not in CD4<sup>+</sup> T cells in BB rats developing diabetes compared to their congenic littermates. *Molecular immunology.* 2011, 48, 4, 399–407.
  21. Tian J., Chau C., Hales T. G., Kaufman D. L. GABA receptors mediate inhibition of T-cell responses. *J. Neuroimmunol.* 1999, 1, 21–28.
  22. Bandyopadhyay B. C., Poddar M. Hypocampic GABAergic activity and T-cell proliferation in aged mammal; effect of dietary protein. *Neurochem. Int.* 1998, 32, 191–196.
  23. Idova G., Alperina E. L., Cheido M. A. Contribution of brain dopamine, serotonin and opioid receptors in the mechanisms of neuroimmunomodulation: evidence from pharmacological analysis. *Inter. Immunopharmacol.* 2012, 12, 4, 618–625.
  24. Lingford-Hughes A. R., Watson B., Kalk N., Reid A. Neuropharmacology of addiction and how it informs treatment. *Br. Med. Bull.* 2010, 96, 93–110.
  25. Савкин И. В., Маркова Е. В., Шушпанова Т. В., Новожеева Т. П., Козлов В. А. Влияние антиконвульсанта галодиф на алкогольную мотивацию, рецепторные системы и цитокины в мозге в эксперименте. *Российский иммунологический журнал* 2018, 12 (21), 733–735. [Savkin I. V., Markova E. V., Shushpanova T. V., Novozheeva T. P., Kozlov V. A. The effect of halodif anticonvulsant on alcohol motivation, receptor systems and cytokines in the brain in an experiment. *Russian Journal of Immunology* 2018, 12(21), 733–735].
  26. Shushpanova T., Novozheeva T., Solonskii A., Bokhan N., Markova E. Molecular targets of the ethanol and original anticonvulsant in the treatment of alcohol dependence. *European Psychiatry* 2017, 41(S), 350.

## PSYCHONEUROIMMUNOMODULATORY EFFECTS OF THE ORIGINAL ANTICONVULSANT AT EXPERIMENTAL ALCOHOLISM

© 2019 E. V. Markova<sup>1,2\*</sup>, I. V. Savkin<sup>1</sup>, M. A. Knyazheva<sup>1</sup>,  
T. V. Shushpanova<sup>3</sup>, T. P. Novozheeva<sup>3</sup>

\*E-mail: evgeniya\_markova@mail.ru

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Scientific Research Institute of the fundamental and clinical immunology, Novosibirsk, Russia;

<sup>2</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Novosibirsk State Pedagogical University», Novosibirsk, Russia;

<sup>3</sup>Mental Health Research Institute “Tomsk Scientific Research Medical Center of Russian Academy of Sciences”, Tomsk, Russia

**Received:** 16.05.2019. **Accepted:** 23.06.2019

An essential link in the pathogenesis of alcohol dependence is a violation of the mechanisms of neuroimmune interaction, which determines the prospect of finding new effective and safe pharmacological correction tools that act on the molecular targets of the ethanol influence in the central nervous system and can correct neuroimmune dysregulation. A positive psychoneuroimmunomodulating effect was demonstrated in the experimental alcohol dependence of the original anticonvulsant, which has a modulating effect on the GABA / benzodiazepine receptor complex. The effect was expressed in the reduction of pathological craving for alcohol, stimulation of parameters of exploratory behavior and immune response, which makes the use of anticonvulsant in the therapy of chronic alcoholism promising and can provide a new pharmacotherapeutic approach to the prevention and treatment of this disease.

*Key words:* alcoholism, original anticonvulsant, behavior, immune response

**Authors:**

**Markova E. V.**, ✉ MD, head of the Neuroimmunology laboratory, chief researcher of the Federal State Budgetary Scientific Research Institute of the Fundamental and Clinical Immunology; Professor of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Novosibirsk State Pedagogical University», Novosibirsk, Russia;

Novosibirsk, Federal State Budgetary Scientific Research Institute of the Fundamental and Clinical Immunology, Neuroimmunology laboratory. Phone: +7(383) 222-06-72, +79039346786, **E-mail:** evgeniya\_markova@mail.ru;

**Savkin I. V.**, researcher of the Neuroimmunology laboratory of the Federal State Budgetary Scientific Research Institute of the Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

**Knyazheva M. A.**, postgraduate student of the Neuroimmunology laboratory of the Federal State Budgetary Scientific Research Institute of the Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

**Shushpanova T. V.**, PhD, leading researcher, laboratory of clinical psychoneuroimmunology and neurobiology of Mental Health Research Institute “Tomsk Scientific Research Medical Center of Russian Academy of Sciences”, Tomsk, Russia;

**Novozheeva T. P.**, BD, senior researcher, Laboratory of clinical psychoneuroimmunology and neurobiology of Mental Health Research Institute “Tomsk Scientific Research Medical Center of Russian Academy of Sciences”, Tomsk, Russia.

## ВЛИЯНИЕ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ *STREPTOCOCCUS PYOGENES* НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ И ЭКСПРЕССИЮ АКТИВАЦИОННЫХ МАРКЕРОВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ВЕНЫ ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ЧЕЛОВЕКА

© 2019 г. Дж. Т. Маммедова<sup>1,2\*</sup>, Л. А. Булова<sup>1</sup>, А. Б. Малашичева<sup>3,4</sup>, Д. С. Семёнова<sup>3,4</sup>, И. С. Фрейдлин<sup>1,5</sup>, Э. А. Старикова<sup>1,5</sup>

\*E-mail: jennet\_m@mail.ru

<sup>1</sup>ФГБНУ «Институт Экспериментальной Медицины», Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский Государственный Технологический Институт (Технический Университет), Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup>ФГБУ «Национальный Медицинский Исследовательский Центр имени В. А. Алмазова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>4</sup>Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>5</sup>ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 18.05.2019. Принята: 26.06.2019

Аргинин является важнейшим нутриентом, участвующим в регуляции гомеостаза, тонуса сосудов, а также развитии воспаления и иммунного ответа. Дефицит аргинина, вызванный бактериальной аргининдеиминазой, может приводить к развитию эндотелиальной дисфункции. В настоящей работе с использованием супернатантов разрушенных стрептококков (СРС) *S. pyogenes* исходного штамма (M49-16) и его изогенного мутанта с инактивированным геном аргининдеиминазы *ArcA* (M49-16del*ArcA*), исследовали влияние фермента на пролиферативную активность и экспрессию адгезионных молекул на эндотелиальных клетках вены пупочного канатика человека (HUVEC). Распределение клеток по фазам клеточного цикла и экспрессию поверхностных молекул оценивали методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител. Было показано, что под влиянием СРС исходного штамма происходило достоверное снижение пролиферативной активности HUVEC и повышался уровень экспрессии адгезионных молекул CD62P, ICAM-1 и тканевого фактора CD142. СРС мутантного штамма не оказывал достоверного влияния на исследуемые параметры. Экспрессия рецептора VEGFR-2 в присутствии супернатантов обоих штаммов не изменялась. Полученные результаты показали, что стрептококковая аргининдеиминаза может способствовать развитию эндотелиальной дисфункции, воспаления, усилению процессов коагуляции.

**Ключевые слова:** эндотелиальные клетки, L-аргинин, аргининдеиминаза, *S. pyogenes*, пролиферация, адгезионные молекулы

DOI: 10.31857/S102872210007258-8

**Адрес:** 197376, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12, ФГБНУ «Институт Экспериментальной медицины», отдел иммунологии, Маммедова Дженнет Тумаровна.  
Тел: +7(812)234–6868.

**E-mail:** starickova@yandex.ru

**Авторы:**

**Маммедова Д. Т.**, аспирант СПбГТИ(ТУ), младший научный сотрудник лаборатории общей иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ «Институт Экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия;

**Булова Л. А.**, д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт Экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия;

**Малашичева А. Б.**, к.б.н., заведующая лабораторией Молекулярной Кардиологии института Молекулярной Биологии и Генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, доцент кафедры эмбриологии биологического факультета СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия;

**Семёнова Д. С.**, аспирант СПбГУ, лаборант-исследователь лаборатории Молекулярной Кардиологии института Моле-

кулярной Биологии и Генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, младший научный сотрудник лаборатории Регенеративной Биомедицины института Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

**Фрейдлин И. С.**, д.м.н., член-корреспондент РАН, профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции отдела иммунологии ФГБНУ «Институт Экспериментальной медицины», профессор кафедры иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Старикова Э. А.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции отдела иммунологии ФГБНУ «Институт Экспериментальной медицины», доцент кафедры иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия.

## ВВЕДЕНИЕ

Истощение нутриентов в микроокружении клеток организма-хозяина является одной из самых распространенных стратегий, которые используют патогенные микроорганизмы [1]. Экспрессия аргинин-гидролизующего фермента – аргининдеиминазы (АД) позволяет бактериям выживать в условиях гипоксии, низкой кислотности в очаге воспаления, фаголизосомах и истощает L-аргинин в микроокружении клеток организма-хозяина [2, 3]. L-аргинин играет существенную роль в регуляции функций эукариотических клеток, в первую очередь – эндотелиальных, т.к. является предшественником ряда важных для эндотелиальных клеток (ЭК) метаболитов, таких как оксид азота (NO), полиамины, пролин и агматин [4]. Также, L-аргинин работает, как сигнальная молекула, в рамках mTOR (mechanical target of rapamycin) зависимого внутриклеточного сигнального пути, контролирующего метаболизм, пролиферацию, аутофагию и синтез регуляторных молекул [5]. Активный mTOR обеспечивает гликолитический тип метаболизма, который в эндотелиальных клетках доминирует над процессами окислительного фосфорилирования. Это позволяет генерировать большие количества АТФ в единицу времени, и минимизировать потребление кислорода, чтобы улучшать его доступ в ткани. Кроме того, переключение типов метаболизма играет важную роль при дифференцировке ЭК в ходе ангиогенеза [6].

Эндотелий сосудов участвует в ангиогенезе, регулирует гомеостаз и тонус сосудов, процессы коагуляции/фибринолиза, а также развитие воспаления и иммунный ответ [7]. Дефи-

цит L-аргинина при бактериальной инфекции может приводить к развитию эндотелиальной дисфункции. Одним из основных маркеров активации и/или повреждения ЭК является повышение уровня экспрессии адгезионных молекул и тканевого фактора, что способствует развитию воспаления и тромбоза. Снижение процессов пролиферации тесно связано с клеточным старением и эндотелиальной дисфункцией [8].

**Цель исследования** состояла в изучении влияния аргининдеиминазы *S. pyogenes* на пролиферативную активность, экспрессию рецептора VEGFR2 и адгезионных молекул на эндотелиальных клетках вены пупочного канатика человека HUVEC.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Приготовление супернатантов разрушенных стрептококков (CPC)*

CPC оригинального штамма *S. pyogenes* тип M49-16, и его изогенного мутанта с делецией гена *ArcA* (M49-16del*ArcA*), содержащие биологически активные внутриклеточные компоненты, были получены, как описано в предыдущих исследованиях [3, 9]. CPC вносили в нетоксичном для клеток разведении 1/100.

### *Получение клеток вены пупочного канатика (HUVEC)*

Эндотелиальные клетки выделяли из вены пупочного канатика человека по адаптированной стандартной методике [10]. Пуповины получали из перинатального центра ФГБУ «НМИЦ им. Алмазова». Все пациентки подписывали информированное согласие. С момента родов до выделения клеток проходило не более 48 часов. Вены канюлировали и инкубировали с коллагеназой второго типа (Worthington, США) 140 ед./мл в DMEM (Биолот, Россия), в течение 10 минут на водяной бане при 37 °С. Полученная суспензия клеток осаждалась центрифугированием при 300 g в течение 5 мин, далее клетки ресуспендировали в полной культуральной среде EGM (Sciencell, США) и высевали в культуральные флаконы (Sarstedt, Германия), покрытые 0,2% раствором желатина (Sigma, США). Пересев производили дважды в неделю. Дезинтеграцию монослоя вызывали инкубацией в растворе Трипсин-Версена (Sigma, США) при 37 °С. В экспериментах использовали клетки 3–5 пассажа. Все работы с клетками человека соответствовали Хельсинской декларации. Клетки культиви-

ровали в среде Endothelial Cell Basal Medium-2 (ECBM-2) (Promocell, США) с добавлением ростовой добавки Supplement Mix (Promocell, США). Пересев культуры производили дважды в неделю. Дезинтеграцию монослоя осуществляли с использованием раствора Трипсин-ЭДТА (Sigma, США). Для проведения экспериментов использовали клетки 3–5 пассажа.

#### *Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла*

Для изучения распределения клеток по фазам клеточного цикла клетки засеивали в 6-ти луночный планшет (Sarstedt, Германия) по 300 тысяч клеток в 1 мл культуральной среды. Клетки инкубировали с исследуемыми субстанциями 72 часа при 37°С во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Для оценки доли клеток в фазах синтеза (S/G<sub>2</sub>) производили окрашивание клеточной суспензии с использованием моноклональных антител против циклина A2, Anti-Cyclin A2-FITC, кат. № PNA22327 (Beckman Coulter, США). Для этого клетки пермеабилizировали 80% ледяным метанолом. После чего проводили окрашивание клеточной суспензии антителами против циклина A2 в соответствии с рекомендациями производителя. Для оценки количества ДНК в клетках дополнительно проводили окрашивание клеточной суспензии ДНК-связывающим красителем DAPI (Invitrogen, США). Для этого к клеткам вносили DAPI в концентрации 300 нМ и инкубировали 10 минут. Анализ образцов проводили с использованием проточного цитофлуориметра Navios™ (Beckman Coulter, США).

#### *Анализ экспрессии поверхностных маркеров HUVES*

Для анализа экспрессии поверхностных маркеров суспензию клеток вносили в 24 (Sarstedt, Германия) луночный планшет по 150 тысяч в 500 мкл полной культуральной среды ECBM-2 (Promocell, США). Клетки инкубировали 48 часов при 37°С во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> до образования конфлюэнтного монослоя. В качестве стандартного активатора эндотелиальных клеток использовали рекомбинантный препарат цитокина TNFα – «Рефнолин» (специфическая активность препарата 1 ЕД – 0,06 нг) в концентрации 50 ЕД/мл. После внесения исследуемых веществ, клетки инкубировали 24 часа при 37°С во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. По окончании инкубации производили дезинтеграцию моно-

слоя аккутазой (Sigma, США), клеточные суспензии переносили в пробирки для проточной цитометрии (Beckman Coulter, США). Экспрессию поверхностных молекул оценивали методом проточной цитометрии с помощью моноклональных антител анти-CD62PFITC, кат. № A07790, анти-CD106PE, кат. № PN A66085, анти-CD54PE, кат. № PN IM1239U, анти-CD142PE, кат. № 550312, анти-CD146PC5, кат. № PN A22364, анти-CD309PC7, кат. № A64616 (Beckman Coulter, США). Окрашивание клеточных суспензий проводили в соответствии с рекомендацией производителя. Для оценки уровня некроза дополнительно проводили окрашивание клеточной суспензии ДНК-связывающим красителем DAPI (Invitrogen, США). Анализ образцов проводили с использованием проточного цитофлуориметра Navios™ (Beckman Coulter, США).

#### *Статистическая обработка данных*

Анализ и обработку данных производили с помощью программы STATISTICA 5.0 с использованием t-критерия Стьюдента.

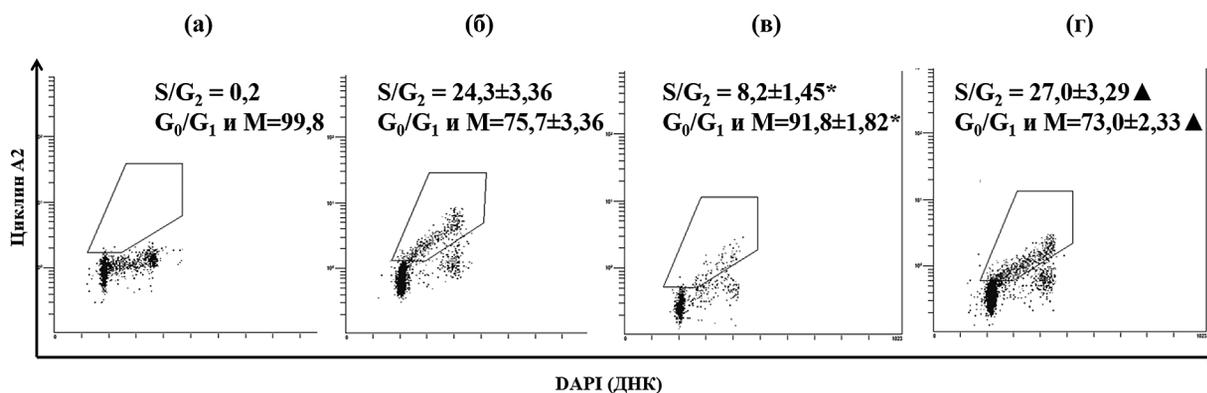
## РЕЗУЛЬТАТЫ

#### *Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла*

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла показал, что в стандартных условиях культивирования доля клеток в фазах синтеза (S/G<sub>2</sub>) составляла 24,3% (**Рисунок 1, а**). Инкубация клеток в присутствии СРС исходного штамма приводила к достоверному снижению доли клеток в фазах синтеза до 8,2% при одновременном повышении доли клеток в фазах покоя (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) до 91,8% (**Рисунок 1, б**). При инкубации с СРС мутантного штамма доля клеток, в фазах синтеза была достоверно ниже, чем тот же показатель для клеток, инкубируемых с СРС М49-16 и оставляла 27% (**Рисунок 1, в**). Распределение клеток по фазам клеточного цикла в присутствии СРС изогенного мутанта не отличалось от того же параметра у клеток, культивируемых в стандартных условиях.

#### *Анализ уровня экспрессии поверхностных молекул*

Исследование уровня экспрессии поверхностных молекул показал, что HUVES в стандартных условиях культивирования (**Рисунок 2, б**) не экспрессировали Р-селектин CD62P и ткане-



**Рисунок 1.** Репрезентативный дот-плот (циклин А2 vs DAPI), отражающий распределение клеток по фазам клеточного цикла. а – контроль изотипических антител, б – культуральная среда, в – СРС М49-16, г – СРС М49-16delArcA. **Примечание:** Представлена доля клеток в соответствующих фазах клеточного цикла ( $M \pm m, \%$ ),  $n=6$ . \* Отличия от контроля достоверны при  $p < 0,05$ ; ▲ отличия достоверны от СРС М49-16 при  $p < 0,05$ .

вой фактор CD142. При этом был выявлен низкий уровень экспрессии адгезионных молекул CD106 (VCAM-1), CD54 (ICAM-1), VEGFR-2 и высокий спонтанный уровень экспрессии адгезионной молекулы CD146 (МСАМ). В качестве стандартного активатора ЭК использовали провоспалительный цитокин TNF $\alpha$ . В присутствии TNF $\alpha$  происходило значительное повышение экспрессии адгезионных молекул VCAM-1, ICAM-1 и слабое, но достоверное повышение уровня экспрессии VEGFR-2. Уровень экспрессии других исследуемых маркеров достоверно не изменялся (**Рисунок 2, д**).

Инкубация HUVEC в присутствии СРС исходного штамма (**Рисунок 2, в**) приводила к достоверному усилению экспрессии CD62P, адгезионной молекулы ICAM-1 и тканевого фактора CD142. Уровень экспрессии адгезионной молекул VCAM-1 в присутствии СРС исходного штамма повышался незначительно, и это изменение не было статистически достоверно. Уровень экспрессии МСАМ и VEGFR-2 в присутствии СРС исходного штамма не изменялся.

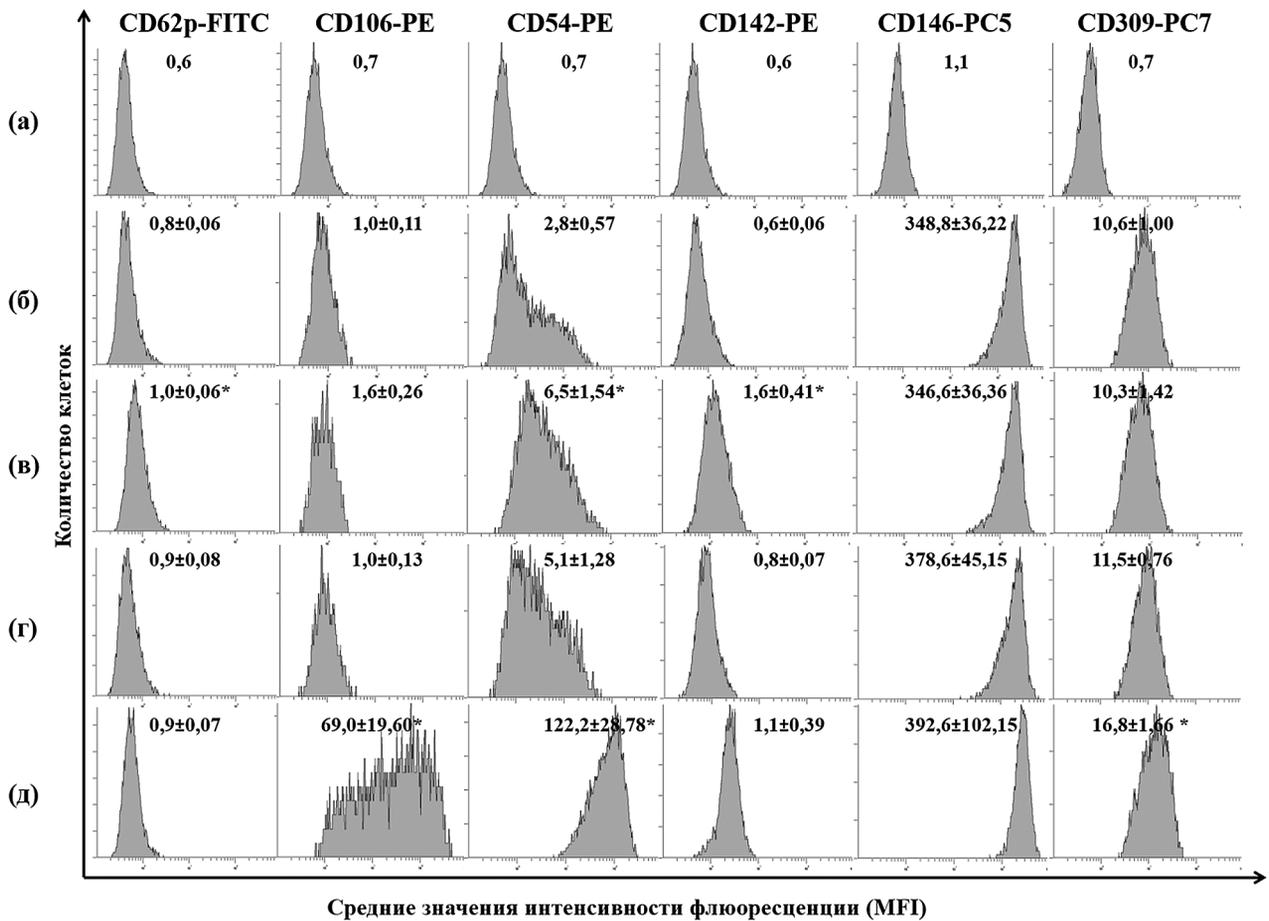
СРС мутантного штамма не оказывал статистически значимого влияния на уровень экспрессии исследуемых молекул (**Рисунок 2, г**).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в данном исследовании результаты показали, что АД в составе СРС является фактором, который вызывает усиление адгезионной и прокоагуляторной активности ЭК. В присутствии СРС исходного штамма на эндотелиальных клетках усиливалась экспрессия ад-

гезионных молекул Р-селектина, ICAM-1, а также тканевого фактора. При этом СРС изогенного мутанта с инактивированным геном АД таким действием не обладал. Известно, что Р-селектины опосредуют роллинг лейкоцитов на поверхности ЭК, а адгезионные молекулы иммуноглобулинового суперсемейства ICAM-1 и VCAM-1 участвуют в прочной адгезии и трансэндотелиальной миграции лейкоцитов в очаг воспаления [7]. Активация эндотелия сопровождается усилением процессов коагуляции, что выражается в повышении экспрессии тканевого фактора на ЭК, продукции фибрина и, в совокупности, приводит к тромбозу [11]. Адгезионная молекула МСАМ локализуется преимущественно на латеральной поверхности ЭК и участвует в формировании межклеточных контактов, регулирует адгезию и трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов. Установлено, что снижение уровня экспрессии МСАМ на ЭК приводит к повышению проницаемости сосудистого эндотелия [12]. Наши исследования показали, что при культивировании HUVEC в присутствии СРС исходного штамма и его изогенного мутанта не происходило достоверного изменения уровня экспрессии МСАМ.

Характерное для сердечно-сосудистых заболеваний воспаление в эндотелиальной выстилке сосудов зачастую сопровождается снижением уровня L-аргинина в плазме [13]. При гипертонии, диабете и дислипидемии повышается экспрессия тканевого фактора на ЭК (CD142) [14]. Повышенная экспрессия на ЭК ICAM-1, VCAM-1, Р-селектина, наблюдает-



**Рисунок 2.** Репрезентативный дот-плот, отражающий уровень экспрессии поверхностных маркеров на HUVEC. а – контроль изотипических антител, б – культуральная среда, в – CPC M49-16, г – CPC M49-16delArcA, д – TNF $\alpha$  (50 ед/мл).

**Примечание:** Представлены средние значения интенсивности флуоресценции ( $M \pm m$ ),  $n=5$ ; \*-отличия от контроля достоверны при  $p < 0,05$ .

ся при атеросклеротических поражениях, как у животных, так и у людей [15, 16]. В тоже время существуют исследования, в которых показано, что под влиянием L-аргинина снижается стимулированная IL-1 $\beta$  экспрессия на HUVEC адгезионных молекул ICAM-1 и VCAM-1 [17]. В работе Yang et al. было установлено, что L-аргинин подавляет экспрессию тканевого фактора в культуре HMEC (human microvascular endothelial cells) [18]. Полученные в данном исследовании результаты согласуются с данными других исследований, и указывают на возможную роль L-аргинина в регуляции экспрессии активационных маркеров на эндотелии.

Одним из механизмов активации эндотелия в условиях дефицита L-аргинина может быть нарушение активности эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS). L-аргинин является един-

ственным субстратом eNOS. Установлено, что дефицит L-аргинина приводит к диссоциации субъединиц этого фермента, вследствие чего снижается синтез NO и повышается продукция активных форм кислорода [19]. АФК в низких концентрациях действуют как сигнальные молекулы, но их гиперпродукция приводит к развитию воспаления и повышению экспрессии адгезионных молекул на ЭК [20]. В исследовании Patel et al. на HUVEC было показано, что культивирование клеток в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> сопровождалось усилением экспрессии P-селектина [21]. Установлена прямая корреляция между усилением оксидативного стресса в сосудистой стенке и повышением экспрессии ICAM-1 и VCAM-1 на ЭК у пациентов с гипергликемией и инсулин-независимым диабетом [22, 23]. Показано, что повышенная продукция АФК при сердечно-

сосудистых заболеваниях, таких как атеросклероз, гиперхолестеринемия, гипертония может приводить к усилению воспаления и коагуляции [24–26].

Обнаруженное в наших исследованиях снижение пролиферативной активности HUVEC под влиянием АД указывает на возможную роль этого фермента в развитии эндотелиальной дисфункции при инфекции. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла, показал, что СРС исходного штамма подавлял пролиферативную активность HUVEC, тогда как СРС мутантного штамма не влиял на исследуемую функцию. Предполагают, что снижение пролиферации ЭК под влиянием АД происходит в результате аргинингидролазной активности фермента из-за истощения L-аргинина [27, 28]. Вследствие деплеции этой аминокислоты, в ЭК происходит угнетение процессов адгезии, пролиферации, миграции, подавление формирования капиллярноподобных структур на матрикеле, что было показано как в наших собственных исследованиях, так и в работах других авторов [3, 27–31]. Park et al. при изучении влияния АД, выделенной из *Mycoplasma spp.* на HUVEC, обнаружили, что пролиферация клеток и синтез NO в условиях дефицита L-аргинина подавляются. Внесение избытка L-аргинина приводит к восстановлению этих показателей [27].

Регуляция процессов пролиферации ЭК происходит с участием рецептора VEGFR2, который осуществляет трансдукцию сигналов от ростовых факторов [32]. Наши эксперименты показали, что экспрессия рецептора VEGFR-2 при инкубации HUVEC в присутствии СРС обоих штаммов не изменялась. Эти результаты указывают на то, что в подавлении пролиферации ЭК под влиянием АД задействованы другие механизмы. Предполагают, что снижение пролиферации ЭК может быть связано с дефицитом L-аргинина в качестве предшественника NO [27], пролина [33], полиаминов [4] и агматина [34]. Повышенная продукция АФК при дефиците субстрата для eNOS [35] и нарушение посттрансляционного аргинилирования белков цитоскелета также может быть причиной ингибции пролиферативной активности ЭК [36]. Дефицит L-аргинина может приводить к ингибции mTOR внутриклеточного сигнального пути и переключению метаболизма с гликолиза на окислительное фосфорилирование, ингибции процессов, связанных с ангиогенезом, в том числе и пролиферации [5, 6].

## ВЫВОДЫ

Сравнение влияния СРС исходного штамма *S. pyogenes* и его изогенного мутанта с инактивированным геном аргининдеиминазы на поверхностный фенотип и пролиферативную активность ЭК показало, что АД может являться фактором, который приводит к старению клеток, эндотелиальной дисфункции из-за развития тромбозов и воспаления.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Cusumano Z. T., Watson M. E. Jr., Caparon M. G.. *Streptococcus pyogenes* arginine and citrulline catabolism promotes infection and modulates innate immunity. *Infection and Immunity* 2014, 82(1), 233–242.
2. Gallego P., Planell R., Benach J., Querol E., Perez-Pons J. A., Reverter D. Structural characterization of the enzymes composing the arginine deiminase pathway in *Mycoplasma penetrans*. *PLoS One* 2012, 7(10), e47886.
3. Starikova E. A., Sokolov A. V., Vlasenko A. Y., Burova L. A., Freidlin I. S., Vasilyev V. B. Biochemical and biological activity of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* M22. *Biochemistry and Cell Biology* 2016, 94(2), 129–37.
4. Morris S. M. Jr. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *Journal of Nutrition* 2007, 137(6), 1602S–1609S.
5. Saxton R. A., Sabatini D. M. mTOR signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 2017, 168(6), 960–976.
6. Laplante M., Sabatini D. M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012, 149(2), 274–293.
7. Danese S., Dejana E., Fiocchi C. Immune Regulation by Microvascular Endothelial Cells: Directing Innate and Adaptive Immunity, Coagulation, and Inflammation. *Journal of Immunology* 2007, 178(10), 6017–6022.
8. Bochenek M. L., Schütz E., Schäfer K. Endothelial cell senescence and thrombosis: Ageing clots. *Thrombosis Research* 2016, 147, 36–45.
9. Старикова Э. А., Карасева А. Б., Бурова Л. А., Суворов А. Н., Соколов А. В., Васильев В. Б., Фрейдлин И. С. Роль аргининдеиминазы *Streptococcus pyogenes* M49-16 в ингибции пролиферации эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926. *Медицинская иммунология* 2016, 18(6), 555–562. [Starikova E., Karaseva A., Burova L., Suvorov A., Sokolov A., Vasilyev V., Freydlin I. Role of *Streptococcus pyogenes* M49-16 arginine deiminase in inhibition proliferation of human endothelial cell line EA.hy926. *Medical Immunology*, 2016, 18(6) 555–562]
10. Baudin B., Bruneel A., Bosselut N., Vaubourdolle M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nature Protocols* 2007, 2, 481–485.
11. O'Reilly F. M., Casper K. A., Otto K. B., Sexton S. A., Swerlick R. A. Regulation of tissue factor in microvascular dermal endothelial cells. *Journal of Investigative Dermatology* 2003, 120(3), 489–494.

12. Kratzer A., Chu H. W., Salys J., Moumen Z., Leberl M., Bowler R., Cool C., Zamora M., Taraseviciene-Stewart L. Endothelial cell adhesion molecule CD146: implications for its role in the pathogenesis of COPD. *Journal of Pathology* 2013, 230(4), 388–398.
13. Rosenthal M. D., Carrott P. W., Patel J., Kiraly L., Martindale R. G. Parenteral or Enteral Arginine Supplementation Safety and Efficacy. *Journal of Nutrition* 2016, 146(12), 2594S-2600S
14. Breitenstein A., Tanner F. C., Lüscher T. F. Tissue Factor and Cardiovascular Disease. *Circulation Journal* 2010, 7 (1), 3.
15. Sakai A., Kume N., Nishi E., Tanoue K., Miyasaka M., Kita T. P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 are focally expressed in aortas of hypercholesterolemic rabbits before intimal accumulation of macrophages and T lymphocytes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1997; 17, 310–316.
16. Davies M. J., Gordon J. L., Gearing A. J., Pigott R., Woolf N., Katz D., Kyriakopoulos A. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *Journal of Pathology* 1993, 171, 223–229.
17. Adams M. R., Jessup W., Hailstones D., Celermajer D. S. L-arginine reduces human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial expression of cell adhesion molecules. *Circulation* 1997, 95(3), 662–668.
18. Yang Y., Loscalzo J. Regulation of tissue factor expression in human microvascular endothelial cells by nitric oxide. *Circulation* 2000, 101, 2144–2148
19. Romero M., Jiménez R., Sánchez M., López-Sepúlveda R., Zarzuelo M. J., O'Valle F., Zarzuelo A., Pérez-Vizcaino F., Duarte J. Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: Role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. *Atherosclerosis* 2009, 202, 58–67.
20. Kim S. R., Bae Y. H., Bae S. K., Choi K. S., Yoon K. H., Koo T. H., Jang H. O., Yun I., Kim K. W., Kwon Y. G., Yoo M. A., Bae M. K. Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008, 1783 (5), 886–895.
21. Patel H., Chen J., Kavdia M. Induced peroxidase and cytoprotective enzyme expressions support adaptation of HUVECs to sustain subsequent H2O2 exposure. *Microvascular Research* 2016, 103, 1–10.
22. Ceriello A., Novials A., Ortega E., La S. L., Pujadas G., Testa R., Bonfigli A. R., Esposito K., Giugliano D. Evidence that hyperglycemia after recovery from hypoglycemia worsens endothelial function and increases oxidative stress and inflammation in healthy control subjects and subjects with type 1 diabetes. *Diabetes* 2012, 61, 2993–2997.
23. Nappo F., Esposito K., Cioffi M., Giugliano G., Molinari A. M., Paolisso G., Marfella R., Giugliano D. Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. *Journal of the American College of Cardiology* 2002, 39, 1145–1150.
24. Huo Y., Ley K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiologica Scandinavica* 2001, 173, 35–43.
25. Krieglstein C. F., Granger D. N. Adhesion molecules and their roles in vascular disease. *American Journal of Hypertension* 2001, 14, 44S-54S.
26. Blann A. D., Nadar S. K., Lip G. Y. H. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *European Heart Journal* 2003, 24(24), 2166–2179.
27. Park I. S., Kang S. W., Shin Y. J., Chae K. Y., Park M. O., Kim M. Y., Wheatley D. N., Min B. H. Arginine deiminase: a potential inhibitor of angiogenesis and tumour growth. *British Journal of Cancer* 2003, 89(5), 907–914.
28. Beloussow K., Wang L., Wu J., Ann D., Shen W. C. Recombinant arginine deiminase as a potential antiangiogenic agent. *Cancer Letters* 2002, 183(2), 155–162.
29. Старикова Э. А., Маммедова Дж. Т., Бурова Л. А., Соколов А. В., Васильев В. Б., Фрейдлин И. С. Влияние аргининдеиминазы *Streptococcus pyogenes* на миграционную активность и структуру цитоскелета эндотелиальных клеток человека. *Медицинская Иммунология* 2017, 19(5), 521–528. [Starikova E. A., Mammedova J. T., Burova L. A., Sokolov A. V., Vasilyev V. B., Freidlin I. S. The effect of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* on migration activity of the human endothelial cells and their cytoskeleton structure. *Medical Immunology* 2017, 19(5), 521–528].
30. Старикова Э. А., Лебедева А. М., Бурова Л. А., Фрейдлин И. С. Изменение функциональной активности эндотелиальных клеток под влиянием лизата *S. pyogenes*. *Цитология* 2012, 54, (1) 49–57. [Starikova E. A., Lebedeva A. M., Burova L. A., Freidlin I. S. Regulation of endothelial cells functions by ultrasonic supernatant of *Streptococcus pyogenes*. *Tsitologiya* 2012, 54(1), 49–57.]
31. Маммедова Дж. Т., Старикова Э. А., Бурова Л. А., Малашичева А. Б., Семёнова Д. С., Фрейдлин И. С. Влияние аргининдеиминазы *S. pyogenes* на пролиферативную и миграционную активность эндотелиальных клеток вены пупочного канатика человека// *Цитокины и воспаление* 2017, 3, 48–51. [Mammedova J. T., Starikova E. A., Burova L. A., Malashicheva A. B., Semenova D. S., Freidlin I. S. The effect of arginine deiminase from *S. pyogenes* on the proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells. *Cytokines and inflammation* 2017, 3, 48–51.]
32. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-Receptor2: its biological functions, major signaling pathway, and specific ligand VEGF-E. *Endothelium* 2006, 13(2), 63–69.
33. Grillo M. A., Colombatto S. Arginine revisited: minireview article. *Amino Acids* 2004, 26(4), 345–51.
34. Grillo M. A., Colombatto S. Metabolism and function in animal tissues of agmatine, a biogenic amine formed from arginine. *Amino Acids* 2004, 26(1), 3–8.
35. Förstermann U., Li H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. *British Journal of Pharmacology* 2011, 164(2), 213–23.
36. Kwon, Y. T., Kashina, A. S., Davydov, I. V., Hu, R. G., An, J. Y., Seo, J. W., Du, F., Varshavsky, A. An essential role of N-terminal arginylation in cardiovascular development. *Science* 2002, 297(5578), 96–99.

## THE EFFECT OF *STREPTOCOCCUS PYOGENES* ARGININE DEIMINASE ON HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS PROLIFERATION AND ACTIVATION MARKERS EXPRESSION

© 2019 J. T. Mammedova<sup>1,2\*</sup>, L. A. Burova<sup>1</sup>, A. B. Malashicheva<sup>3,4</sup>, D. S. Semenova<sup>3,4</sup>, I. S. Freidlin<sup>1,5</sup>, E. A. Starikova<sup>1,5</sup>

\*E-mail: jennet\_m@mail.ru

<sup>1</sup>FSBSI "Institute of Experimental Medicine", Saint-Petersburg, Russia;

<sup>2</sup>St. Petersburg State Technological University (Technical University), Saint-Petersburg, Russia;

<sup>3</sup>FSBSI "Almazov National Medical Research Centre", Saint-Petersburg, Russia;

<sup>4</sup>St. Petersburg University, Saint-Petersburg, Russia;

<sup>5</sup>Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, Russia;

Received: 18.05.2019. Accepted: 26.06.2019

Arginine is an important nutrient involved in the regulation of homeostasis, vascular tone, as well as the development of inflammation and immune response. Arginine deficiency caused by bacterial arginine-deiminase can lead to endothelial dysfunction. In the present study, using the Supernatants of Destroyed Streptococcal Cells (SDSCs) of the original strain (*S. pyogenes* M49-16) and its isogenic mutant with the inactivated gene of arginine-deiminase *ArcA* (M49-16del*ArcA*), the effect of arginine deiminase on the proliferative activity and expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) was evaluated. Cell distribution by cell cycle phases and expression of surface molecules were investigated by flow cytometry using monoclonal antibodies. It was shown that the original strain SDSC significantly reduced the proliferative activity of HUVEC and increased the expression of adhesion molecules CD62P, ICAM-1 and tissue factor CD142. The SDSC of the mutant strain did not have any effect. In the presence of supernatants of both strains, the expression of VEGFR-2 receptor did not change. The results showed that streptococcal arginine deiminase promotes development of endothelial dysfunction, inflammation, and coagulation.

**Key words:** HUVEC, L-arginine, arginine deiminase, *Streptococcus pyogenes*, proliferation, adhesion molecules

### Authors:

**Mammedova J. T.**, ☒ post-graduate student of St. Petersburg State Technological University (Technical University), Junior scientific researcher, Dept. of immunology, FSBSI "Institute of Experimental Medicine", Saint-Petersburg, Russia; 197376, Saint-Petersburg, Academic Pavlov st., 12, FSBSI "Institute of Experimental Medicine". Phone: +7(812)234-6868, E-mail: jennet\_m@mail.ru;

**Burova L. A.**, MD, Leading Researcher scientific researcher, Dept. of molecular microbiology of FSBSI "Institute of Experimental Medicine", Saint-Petersburg, Russia;

**Malashicheva A. B.**, PhD, Group Leader, Laboratory of Molecular Cardiology, Federal Almazov Medical Research Centre, Associate Professor, Dept. of Embryology, Biological Faculty, St.-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia;

**Semenova D. S.**, post-graduate student of St.-Petersburg University, Laboratory Technician Researcher Laboratory of Molecular Cardiology, Federal Almazov Medical Research Centre, Junior Researcher, Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology, RAS, Saint-Petersburg, Russia;

**Freidlin I. S.**, MD, corresponding member of RAS, Professor, Chief scientific researcher, Dept. of immunology, FSBSI "Institute of Experimental Medicine", professor, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, Russia;

**Starikova E. A.**, PhD, Senior scientific researcher, Dept. of immunology, FSBSI "Institute of Experimental Medicine", assistant professor, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, Russia.

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

© 2019 г. С. Е. Никонова<sup>1\*</sup>, Л. В. Рябова<sup>2</sup>, К. В. Никушкина<sup>2</sup>,  
И. В. Емельянов<sup>2</sup>

\*E-mail: nikonova\_se@mail.ru

<sup>1</sup>МАУЗ Ордена Трудового Красного Знамени «Городская клиническая больница № 1»,  
Челябинск, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»  
Минздрава РФ, Челябинск, Россия

Поступила: 26.05.2019. Принята: 29.06.2019

Был обследован 21 пациент с диагнозом ХОБЛ II–IV стадии, стаж курения составил  $36,9 \pm 2,92$  лет. В данной группе больных было проведено исследование иммунологического статуса. Проведенное иммунологическое исследование подтвердило наличие хронизации иммунологического воспаления у пациентов с ХОБЛ.

**Ключевые слова:** хроническая обструктивная болезнь легких, иммунологические изменения

DOI: 10.31857/S102872210007259-9

Адрес: 454048, г. Челябинск, улица Воровского, 16, Муниципальное автономное учреждение здравоохранения Ордена Трудового Красного Знамени «Городская клиническая больница № 1», Никонова Светлана Евгеньевна.

Тел.: +7(351) 7284924, 89127965212 (моб.).

E-mail: nikonova\_se@mail.ru

**Авторы:**

**Никонова С. Е.**, заведующая пульмонологическим отделением МАУЗ Ордена Трудового Красного Знамени «Городская клиническая больница № 1», Челябинск, Россия;

**Рябова Л. В.**, д. м. н., профессор кафедры пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Челябинск, Россия;

**Никушкина К. В.**, к. м. н., ведущий научный сотрудник ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, «НИИ Иммунологии», Челябинск, Россия;

**Емельянов И. В.**, старший лаборант, ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава РФ «НИИ иммунологии», Челябинск, Россия.

### АКТУАЛЬНОСТЬ

ХОБЛ является серьезной медико-социальной проблемой. Больные с данной патологией имеют снижение качества жизни и инвалидизацию по данному заболеванию [1, 3]. За последние годы отмечается рост заболеваемости до 15% в популяции, что требует более пристального внимания к данной группе больных, что озна-

чает раннее выявление и снижение факторов риска. Хроническое воспаление, затрагивающее разные уровни иммунологического статуса, является основой и одним из главных факторов, влияющих на течение болезни и определяющее степень тяжести [1, 2].

Именно поэтому, изучение иммунологического статуса является востребованным аспектом на протяжении многих лет.

**Цель исследования** — определить особенности иммунологического статуса у больных ХОБЛ в сравнении со здоровой группой.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено обследование 21 пациента с хронической обструктивной болезнью легких, которые проходили стационарное лечение в пульмонологическом отделении городской клинической больницы № 1 г. Челябинска. Все обследованные были мужского пола и имели средний возраст  $63,7 \pm 2,25$  лет. Стаж курения в данной группе составил  $36,9 \pm 2,92$  лет, индекс пачка-лет был  $44,0 \pm 4,34$ .

Пациенты с бронхиальной астмой, ишемической болезнью сердца, стенокардией напряжения, опухолями различной локализации

в исследование не включались. Хронические сопутствующие заболевания (гипертоническая болезнь, хронический пиелонефрит, кисты почек, печени, язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки) на момент исследования были в стадии ремиссии.

Всем больным проведены клинические, иммунологические, инструментальные методы обследования. Диагноз ХОБЛ II–IV стадии по GOLD подтвержден спирометрически с помощью аппарата MicroLoop (проводилось исследование функции внешнего дыхания с бронхолитиком). Согласно GOLD, соотношение ОФВ1/ФЖЕЛ постбронхолитическое у всех пациентов было равно или менее 0,70. Часть обследованных находилась в стадии персистирующего инфекционного обострения ХОБЛ. Проводилось исследование индуцированной мокроты. Группа условно здоровых лиц была сформирована врачом-терапевтом при проведении углубленного профилактического осмотра, который включал и консультацию врача аллерголога-иммунолога. В данную группу вошли 16 условно здоровых лиц, которые не имели на момент исследования в анамнезе острой и хронической патологии в течение трех месяцев до обследования.

Иммунологическое исследование периферической крови включало в себя определение общего количества лейкоцитов и развернутую лейкоцитарную формулу. Проводилось определение субпопуляций лимфоцитов методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител: CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD45, CD56, HLADR («Beckman Coulter», США) при помощи проточного цитометра «Navios» («Beckman Coulter», США). Для изучения функциональной активности нейтрофилов определяли лизосомальную активность. Результаты оценивали методом люминисцентной микроскопии (использовали краситель акридин оранжевый). Определение фагоцитоза, НСТ-теста проводилось с помощью цифровой микроскопии. Гуморальное звено (3 класса иммуноглобулинов – IgA, IgM, IgG) определялось методом иммуноферментного анализа с помощью ИФА-анализатора «PersonalLab» (Италия).

При статистической обработке данных использовали ПО IBM SPSS Statistics, Version 19. Различия распределения величин между группами определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия между группами считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Большинство пациентов из обследованных, наблюдались пульмонологом или участковым врачом по месту жительства. Всем пациентам была назначена базисная терапия ХОБЛ. Антибактериальная терапия проводилась по показаниям, в соответствии с рекомендациями GOLD по лечению хронической обструктивной болезни легких. Большинство пациентов получали базисную терапию регулярно. Средний стаж заболевания составил  $4,71 \pm 1,10$ . Девять пациентов были в состоянии инфекционного обострения ХОБЛ, что подтверждено наличием повышенного числа лейкоцитов при исследовании общего анализа мокроты. Инфекционная природа обострения ХОБЛ была доказана при бактериологическом исследовании индуцированной мокроты: выделялись золотистый стафилококк, альфа-гемолитический стрептококк в диагностически значимом титре.

По результатам ФВД преобладал обструктивный тип нарушений (модифицированный индекс Тиффно составил  $0,52 \pm 0,03$ ; ОФВ1 был  $1,38 \pm 0,11$  л –  $46,69 \pm 4,14\%$ ) с преимущественной обструкцией на уровне средних бронхов и мелких бронхов (МОС50 –  $0,88 \pm 0,10$  л; МОС75 –  $0,46 \pm 0,07$  л соответственно).

Иммунологические исследования выявили изменения у больных с диагнозом ХОБЛ, которые отличались от иммунологических показателей в группе здоровых.

При анализе полученных данных в периферической крови было выявлено повышение уровня лейкоцитов  $10,66 \pm 0,74 \cdot 10^9$ /л со сдвигом лейкоцитарной формулы влево. Отмечено достоверное снижение относительного числа лимфоцитов.

Также определялись изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов у пациентов с ХОБЛ. Отмечалась активация Т-клеточного звена, в виде достоверного повышения содержания CD3%, CD4% в группе больных с ХОБЛ в сравнении с нормой  $p < 0,05$ , а также выявлено достоверное снижение CD3+CD56+ (%) – Т-NK лимфоцитов в сравнении с нормой  $p < 0,05$ .

При анализе работы фагоцитарного звена установлено достоверное повышение абсолютного и относительного числа нейтрофилов ( $7,63 \pm 0,65$  при норме  $3,83 \pm 0,31$  и  $69,9 \pm 2,33\%$  при норме  $60,09 \pm 1,31\%$  соответственно,  $p < 0,05$ ), достоверное повышение абсолютного количества моноцитов,  $p < 0,05$ . Одновременно с этим установлено достоверное снижение активности индуцированного и спонтанного НСТ-тестов.

Данные исследования подтвердили наличие воспалительного процесса на уровне клетки у больных с ДЗ: ХОБЛ. В то же время тенденция к снижению показателей фагоцитоза – активности, интенсивности и уменьшению фагоцитарного числа нейтрофилов в данной группе больных в сравнении с группой здоровых, свидетельствует о недостаточности противовоспалительных механизмов и формированию хронизации воспалительного процесса, что, в конечном счете, приводит к созданию «порочного» круга – длительно персистирующему прогрессированию заболевания. В итоге процесс принимает самоподдерживающий характер воспаления.

### ВЫВОД

Проведенное иммунологическое исследование подтвердило наличие хронизации иммуно-

логического воспаления, переходящего в самоподдерживающийся процесс.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Хроническая обструктивная болезнь легких: Монография / под ред. Чучалина А. Г. (Серия монографий Российского респираторного общества). – М.: Издательский дом «Атмосфера», 2008. – 568с., ил. [Chronic obstructive pulmonary disease: Monograph / ed. Chuchalina A. G. (A series of monographs of the Russian Respiratory Society). – М.: Atmosphere Publishing House, 2008. – 568с., II].
2. Пульмонология. Национальное руководство. Краткое издание / под ред. акад. РАМН А. Г. Чучалина. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2013. – 800 с. [Pulmonology National leadership. Short edition / ed. Acad. RAMS A. G. Chuchalina. – М.: GEOTAR – Media, 2013. – 800 p].
3. Здравоохранение в России. 2011: Стат.сб./Росстат. – М., 2011. – 326 с. [Health care in Russia. 2011: Stat.sb / Rosstat. – М., 2011. – 326 p].

## IMMUNOLOGICAL CHANGES IMMUNOLOGICAL CHANGES

© 2019 S. E. Nikonova<sup>1\*</sup>, L. V. Ryabova<sup>2</sup>, K. V. Nikushkina<sup>2</sup>,  
I. V. Emelyanov<sup>2</sup>

\*E-mail: nikonova\_se@mail.ru

<sup>1</sup>Municipal Autonomous Healthcare Institution of the Order of the Red Banner of Labor “City Clinical Hospital No. 1”, Chelyabinsk, Russia;

<sup>2</sup>Federal state budgetary educational institution of higher education “South Ural State Medical University”, Chelyabinsk, Russia

Received: 26.05.2019. Accepted: 29.06.2019

21 patients were diagnosed with stage II–IV COPD, the smoking experience was  $36,9 \pm 2,92$  years. In this group of patients a study of immunological status was carried out. The immunological study confirmed the presence of chronic immunological inflammation in patients with COPD.

*Key words:* chronic obstructive pulmonary disease, immunological changes

#### Authors:

**Nikonova S. E.**, ☒ Head of the Pneumology Department of the Municipal Autonomous Healthcare Institution of the Order of the Red Banner of Labor “City Clinical Hospital № 1”, Chelyabinsk, Russia.

454048, Chelyabinsk, Department of the Municipal Autonomous Healthcare Institution of the Order of the Red Banner of Labor “City Clinical Hospital № 1”. Phone: +7(351) 7284924, 89127965212. E-mail: nikonova\_se@mail.ru;

**Ryabova L. V.**, holder of Habilitation degree in medicine, professor of Propaedeutics of Internal Diseases in Federal state budgetary educational institution of higher education “South Ural State Medical University”, Chelyabinsk, Russia;

**Nikushkina K. V.**, PhD, Leading Researcher, Research Institute of Immunology Federal state budgetary educational institution of higher education “South Ural State Medical University”, Chelyabinsk, Russia;

**Emelyanov I. V.**, Senior Assistant, Research Institute of Immunology Federal state budgetary educational institution of higher education “South Ural State Medical University”, Chelyabinsk, Russia.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ КУРКУМИНА В СОСТАВЕ РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ IgG И IgM В СЫВОРОТКЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ КРОНА

© 2019 г. М. В. Осиков, Е. В. Симонян, А. Е. Бакеева\*,  
М. С. Бойко

\*E-mail: a.kurenkova01@yandex.ru

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский Государственный Медицинский Университет»  
Минздрава РФ, Челябинск, Россия

Поступила: 26.05.2019. Принята: 29.06.2019

Применение противовоспалительных средств (5-аминосалициловой кислоты (5-АСК), глюкокортикоидов) и цитостатиков при болезни Крона (БК) ограничено широким спектром побочных эффектов и требует разработки новых терапевтических подходов. Целью настоящего исследования явилось изучение влияния ректальных суппозиторий оригинального состава с 80% спиртовым экстрактом куркумы на концентрацию в сыворотке IgG и IgM при экспериментальной БК. Работа выполнена на 70 белых крысах линии Wistar, БК моделировали ректальным введением раствора тринитробензолсульфоновой кислоты (ТНБС), экстракт куркумы в составе ректальных суппозиторий оригинального состава на основе полиэтиленгликоля применяли каждые 12 часов, в группе сравнения по той же схеме применяли ректальные суппозитории с 5-АСК. Концентрацию в сыворотке IgG и IgM определяли иммуноферментным методом с помощью специфических для крыс тест-систем на 3, 5 и 7 сутки эксперимента. Установлено, что при экспериментальной БК в сыворотке крыс увеличивается концентрация IgG и IgM на 3, 5 и 7 сутки эксперимента. Применение куркумы в составе ректальных суппозиторий при экспериментальной БК приводит к снижению концентрации IgG и IgM на 3 и 5 сутки наблюдения.

**Ключевые слова:** Болезнь Крона, Ig G, Ig M, куркума, ректальные суппозитории

DOI: 10.31857/S102872210007260-1

Адрес: 454092 Челябинск, ул. Воровского, д. 64, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский Государственный Медицинский Университет» Минздрава РФ, Бакеева Алина Евгеньевна.

Тел. 89000747469. E-mail: a.kurenkova01@yandex.ru

**Авторы:**

**Осиков М. В.**, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патофизиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Челябинск, Россия;

**Симонян Е. В.**, к.фарм.н., доцент, заведующая кафедрой химии и фармации фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Челябинск, Россия;

**Бакеева А. Е.**, лаборант кафедры химии и фармации фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Челябинск, Россия;

**Бойко М. С.**, ассистент кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Челябинск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для базисной терапии болезни Крона (БК) применяют производные 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК), глюкокортикостероиды и др. фармакологические агенты, которые обладают широким спектром побочного действия и ограниченной переносимостью при длительном применении, в связи с чем необходим поиск новых терапевтических подходов. В этом отношении интерес представляет куркумин в составе экстракта корневищ куркумы длинной (лат. *Curcuma longa*), обладающий плейотропным действием, положительный эффект которого был описан при сахарном диабете I типа, ревматоидном артрите и других аутоиммунных и воспалительных заболеваниях [1, 2]. В патогенезе поражения слизистой

оболочки толстого кишечника при БК имеют значение IL-23-зависимая активация Th17-зависимого иммунного ответа с последующим увеличением продукции гуморальных эффекторных факторов иммунитета, в особенности IgM и IgG, имеющих значение в повреждении стенки желудочно-кишечного тракта [3, 4].

**Целью** настоящего исследования явилось изучение влияния ректальных суппозиториях оригинального состава с 80% спиртовым экстрактом куркумы на концентрацию в сыворотке IgG и IgM при экспериментальной БК.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 70 белых крысах линии Wistar массой 240–260 г, случайным образом разделенных на 4 группы: I (n=7) – интактный контроль; II (n=21) – животные с БК; III (n=21) – животные с БК в условиях применения с периодичностью введения равной 12 часам ректальных суппозиториях с 5-АСК; IV (n=21) – животные с БК в условиях применения каждые 12 часов ректальных суппозиториях на основе полиэтиленгликоля («Sigma-aldrich», Germany) с экстрактом корневища растения *Curcuma Longa* – куркумином – оригинального состава (тема охраноспособна). БК моделировали ректальным введением 100 мкл 3% раствора тринитробензолсульфоновой кислоты («Sigma-aldrich», Germany) [5, 6]. Исследования проводили на 3, 5 и 7 сутки от индукции БК. Концентрацию в сыворотке IgG и IgM определяли с помощью специфических для крыс тест-систем фирмы «ELISA Kit» (Китай) на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Personal LAB» (Италия). Данные обрабатывали с помощью пакета программ «Statistica 10.0 for Windows». Отличия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$  с использованием непараметрических критериев Краскелла-Уоллиса, Манна-Уитни, Вальда Вольфовитца, Колмогорова-Смирнова.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что при экспериментальной БК концентрация в сыворотке IgG возрастает на 3, 5, 7 сутки наблюдения с максимумом на 5 сутки (34,11±6,32 г/л (3 сутки); 52,9±5,15 г/л (5 сутки); 22,22±8,11 г/л (7 сутки); контроль 3,01±0,16 г/л;  $p < 0,05$ ), концентрация IgM в сыворотке возрастает на 3, 5 и 7 сутки наблюдения с максимумом на 3 сутки (28,22±3,6 г/л (3 сутки); 20,81±1,58 г/л

(5 сутки); 13,96±2,51 г/л (7 сутки); контроль 10,9±0,73 г/л;  $p < 0,05$ ).

Применение базисной терапии – ректальных суппозиториях с 5-АСК – при экспериментальной БК приводит к снижению концентрации в сыворотке IgG на 3, 5 и 7 сутки с максимальной выраженностью эффекта на 3 сутки наблюдения (6,14±0,23 г/л (3 сутки); 9,19±5,72 г/л (5 сутки); 6,31±0,88 г/л (7 сутки); в качестве групп контроля выступали показатели концентрации IgG при экспериментальной БК), концентрация IgM в сыворотке снижается на 5 и 7 сутки наблюдения с максимальной выраженностью эффекта на 7 сутки эксперимента (15,87±3,85 г/л (3 сутки); 12,83±1,62 г/л (5 сутки); 11,22±1,5 г/л (7 сутки); в качестве групп контроля выступали показатели концентрации IgG при экспериментальной БК). Важно отметить, что концентрация IgM достигает значений интактных животных на 7 сутки эксперимента.

Нами разработан состав и проведен комплекс фармакотехнологических исследований новой лекарственной формы с экстрактом корневищ Куркумы длинной – ректальных суппозиториях (тема охраноспособна, подана заявка на изобретение). Применение у крыс ректальных суппозиториях с экстрактом корневищ Куркумы длинной приводит к снижению концентрации в сыворотке IgG на 3, 5 и 7 сутки наблюдения с максимальным эффектом на 5 сутки (7,27±1,61 г/л (3 сутки); 3,96±1,22 г/л (5 сутки); 8,41±1,57 г/л (7 сутки); в качестве групп контроля выступали показатели концентрации IgG при применении 5-АСК в ходе экспериментальной БК). Концентрация IgM в сыворотке снижается на 3, 5 и 7 сутки, с максимальным эффектом на 5 сутки эксперимента (10,69±2,41 г/л (3 сутки); 7,99±0,80 г/л (5 сутки); 10,89±0,72 г/л (7 сутки); в качестве групп контроля выступали показатели концентрации IgG при применении 5-АСК в ходе экспериментальной БК).

Обнаруженные нами при экспериментальной БК изменения иммунного статуса подтверждают роль Th17-зависимых реакций с участием IgM, IgG, которые активируются IL-23. Активация Th-17 звена иммунного ответа с последующим синтезом и секрецией IgM, IgG, наряду с высокой концентрацией IL-17, который, помимо всего прочего, является мощным хемоаттрактантом, стимулятором поглотительной и киллинговой активности нейтрофилов, моноцитов, макрофагов, в комплексе приводят к повреждению стенки кишечника, локальным и системным клиническим проявлениям при БК.

**Таблица.** Содержание иммуноглобулинов в крови при экспериментальной БК и в условиях применения ректальных суппозиторий с куркумой ( $M \pm m$ )

	Ig G, г/л	Ig M, г/л
Группа 1 Интактные (n=7)	3,01±0,16 3,05 (3,02–3,22)	10,89±0,73 10,89(8,85–11,69)
Группа 2а БК 3 сутки (n=7)	34,11±6,32 34,11(34,11–41,17)*	28,22±3,61 17,64(12,71–28,22)*
Группа 2б БК 5 сутки (n=7)	52,93±5,15 52,93(46,66–56,07)*	20,81±1,58 20,81(20,11–22,93)*
Группа 2с БК 7 сутки (n=7)	22,22±8,11 22,22(10,15–36,46)*	13,96±2,51 17,99(13,96–21,87)*
Группа 3а БК+5-АСК 3 сутки (n=7)	6,14±0,23 6,66(6,14–6,92)#	15,87±3,85 15,87(11,61–26,81)#
Группа 3б БК+5-АСК 5 сутки (n=7)	9,19±5,72 9,19(8,23–9,54) <sup>§</sup>	12,83±1,62 12,83(7,06–13,41) <sup>§</sup>
Группа 3с БК+5-АСК 7 сутки (n=7)	6,31±0,88 6,31(5,61–7,27)&	11,22±1,51 11,22(6,73–11,82)&
Группа 4а БК+ККМ 3 сутки (n=7)	7,27±1,61 7,27(2,84–7,88)#	10,69±2,41 10,69(9,11–11,95)#
Группа 4б БК+ККМ 5 сутки (n=7)	3,96±1,22 3,96(2,94–7,27) <sup>§</sup>	7,99±0,81 7,99(7,01–8,71) <sup>§</sup>
Группа 4с БК+ККМ 7 сутки (n=7)	8,41±1,57 5,26(3,37–8,41)&	10,89±0,72 10,89(10,43–11,29)&

**Примечание:** \*Статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) с группой интактных животных; #Статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) с группой БК на 3 сутки; §Статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) с группой БК 5 сутки; &Статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) с группой БК на 7 сутки.

Продемонстрированы известные противовоспалительные свойства 5-АСК при БК в составе ректальных суппозиторий за счет ингибирования синтеза IL-23, что приводит к снижению синтеза свободных радикалов и метаболитов арахидоновой кислоты (особенно лейкотриенов), тормозит миграцию и деструктивные функции фагоцитов, а также снижению выраженности Th-17-зависимых реакций и продукции IgM, Ig G. Впервые установлены иммуностропные эффекты локального применения экстракта корневищ Куркумы длинной в составе ректальных суппозиторий при экспериментальной БК в виде снижения концентрации в сыворотке IgM и IgG, что свидетельствует об иммуномодулирующем действии куркумина, сопоставимом с таковым при локальном введении 5-АСК. Полученные данные являются фрагментом комплексного исследования по доклиническому изучению эффективности и патогенетическому обоснованию локального применения экстракта корневищ Куркумы

длинной в составе ректальных суппозиторий при БК.

## ВЫВОДЫ

1. При экспериментальной болезни Крона, индуцированной ректальным введением раствора тринитробензолсульфоновой кислоты, в сыворотке крыс увеличивается концентрация IgG и IgM на 3, 5 и 7 сутки эксперимента. Применение при экспериментальной болезни Крона 5-аминосалициловой кислоты в виде ректальных суппозиторий приводит к снижению концентрации в сыворотке IgG на 3, 5 и 7 сутки наблюдения, а IgM – на 3 и 7 сутки.

2. Применение при экспериментальной болезни Крона экстракта корневищ Куркумы длинной в составе ректальных суппозиторий оригинального состава ежедневно с интервалом в 12 ч приводит к снижению концентрации в сыворотке IgG и IgM на 3, 5 и 7 сутки эксперимента, что сопоставимо с локальным применением 5-аминосалициловой кислоты.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Гайдарова А. П., Корощенко Г. А., Айзман Р. И.* Влияние куркумы и куркумина на углеводный обмен при аллоксан-индуцированном сахарном диабете у крыс // Современные проблемы науки и образования. — 2014. — № .5. — С. 597. [*Gajdarova A. P., Koroshchenko G. A., Aizman R. I.* Influence of turmeric and curcumin on carbohydrate metabolism in alloxan-induced diabetic rats // Modern problems of science and education. — 2014. — № .5. — P. 597.]
2. *Gupta S. C., Patchva S., Aggarwal B. B.* Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials // *AAPS J.* — 2013. — № .15(1). — P.195–218.
3. *Cătană C. S., Berindan Neagoe I., Cozma V., Magdaş C., Tăbăran F., & Dumitraşcu D. L.* (2015). Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*, 21(19), 5823–5830.
4. *Castro-Dopico T., Dennison T. W., Ferdinand J. R., Mathews R. J., Fleming A., Clift D., ... Clatworthy M. R.* (2019). Anti-commensal IgG Drives Intestinal Inflammation and Type 17 Immunity in Ulcerative Colitis. *Immunity*, 50(4), 1099–1114.e10.
5. *Осиков М. В. и др.* Экспериментальное моделирование и перспективные направления коррекции гомеостаза при воспалительных заболеваниях кишечника / М. В. Осиков, Е. В. Симонян, А. Е. Бакеева, М. С. Бойко, В. А. Бивалькевич // Аспирантский вестник Поволжья. — 2018. — № . 1–2. — С. 153–160. [*Osikov M. V. et al.* Experimental modeling and perspectives of homeostasis correction in inflammatory bowel diseases / M. V. Osikov, E. V. Simonian, A. E. Bakeeva, M. S. Boiko, V. A. Bivalkevich // The postgraduate bulletin of the Volga region. — 2018. — N. 1–2. P. 153–160.]
6. *Осиков М. В. и др.* Воспалительные заболевания кишечника: выбор оптимальной экспериментальной модели / М. В. Осиков, Е. В. Симонян, А. Е. Бакеева, М. С. Бойко, В. А. Бивалькевич // Современные проблемы науки и образования. — 2017. — № . 3. — С. 70. [*Osikov M. V. et al.* Inflammatory bowel diseases: the choice of the experimental model / M. V. Osikov, E. V. Simonian, A. E. Bakeeva, M. S. Boiko, V. A. Bivalkevich // Modern problems of science and education. — 2017. — #3. — P. 70.]

## COMPARATIVE ANALYSIS OF THE INFLUENCE OF RECTAL SUPPOSITORIA WITH CURCUMIN ON THE CONCENTRATION OF IgG AND IgM IN BLOOD SERUM IN EXPERIMENTAL CROHN'S DISEASE

© 2019 M. V. Osikov, E. V. Simonyan, A. E. Bakeeva\*, M. S. Boiko

\*E-mail: a.kurenkova01@yandex.ru

South Ural State Medical University, Ministry of health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia

Received: 26.05.2019. Accepted: 29.06.2019

The use of anti-inflammatory drugs (5-aminosalicylic acid (5-ASA), glucocorticoids) for Crohn's disease (CD) as a basic therapy is limited to a wide range of side effects and requires the search of new therapeutic approaches. The aim of the work is to study the effect of rectal suppositories of the original composition with 80% spirituous extract of curcumin on the serum concentration of IgG and IgM in experimental CD. The work was performed on 70 Wistar white rats, CD was modeled by rectal administration of 100 µl of a 3% solution of trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS), the extract of curcumin in rectal suppositories of the original composition based on polyethylene glycol was used every 12 hours, in the comparison group rectal suppositories with 5-ASC were used every 12 hours also. The serum concentration of IgG and IgM was determined using specific test systems for rats on an immunoassay analyzer on 3, 5 and 7 days of the experiment. It was determined that in experimental TNBS-induced Crohn's disease in the serum of rats, the concentration of IgG and IgM increases on days 3, 5 and 7 of the experiment. The use of curcumin extract in rectal suppositories of the original composition in experimental CD leads to a decrease in the concentration of IgG and IgM on days 3 and 5 of observation.

*Key words:* Crohn's disease, Ig G, Ig M, curcumin, rectal suppositoria

### Authors:

**Osikov M. V.**, Doctor of Medical Sciences, professor, Head of the Department of Pathophysiology, South-Ural State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

**Simonian E. V.**, Ph.D., Head of the Department of Chemistry and Pharmacy, Pharmaceutical Faculty, South-Ural State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

**Bakeeva A. E.**, ✉ Laboratory assistant of Head of the Department of Chemistry and Pharmacy, Pharmaceutical Faculty, South-Ural State Medical University of the Ministry of Health, Chelyabinsk, Russia. **E-mail:** a.kurenkova01@yandex.ru;

454092 Chelyabinsk, Vorovsky St., 64, Southern Ural State Medical University of the Russian Ministry of Health. Phone: +79000747469

**Boiko M. S.**, Assistant, Department of Pathophysiology, South-Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia.

## КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ДИ-ДЖОРДЖИ

© 2019 г. И. А. Пашнина<sup>1\*</sup>, Е. В. Власова<sup>1</sup>, С. С. Дерябина<sup>2</sup>

\*E-mail: irina\_pashnina@list.ru

<sup>1</sup>ГАУЗ Свердловской области «Областная детская клиническая больница», Екатеринбург, Россия

<sup>2</sup>ГБУЗ Свердловской области Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка», Екатеринбург, Россия

Поступила: 21.05.2019. Принята: 27.06.2019

Обследовано 34 ребенка и 3 взрослых больных с синдромом Ди Джорджи. У 33 из 34 детей выявлена делеция  $del22q11.2$ . У 30 обследованных детей диагностирован врожденный порок сердца, у 12 из них – в сочетании с другими пороками, у всех детей отмечался лицевой дисморфизм. У детей младшего возраста в большей степени была выражена задержка физического и речевого развития. У всех детей были выявлены признаки нарушения противоинфекционной защиты: наблюдались острые и хронические процессы вирусно-бактериальной этиологии различной локализации. Летальные исходы констатированы у четырех детей: у троих – от генерализованного инфекционного процесса, у одного – от гипокальциемического криза. При оценке субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови, снижение абсолютного количества Т-клеток, Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток наблюдалось у 59–68% детей. Снижение количества В-лимфоцитов и натуральных киллеров выявлялось реже: у 26% и 15% больных, соответственно.

**Ключевые слова:** первичные иммунодефициты, синдром Ди-Джорджи, хромосомные аномалии, Т-лимфоциты

DOI: 10.31857/S102872210007261-2

Адрес: 620149 Екатеринбург, ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», Пашнина Ирина Александровна. Тел.: 8(343) 272-91-39; E-mail: irina\_pashnina@list.ru

Авторы:

Пашнина И. А., д.б.н., заведующая клинико-диагностической лабораторией ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», Екатеринбург, Россия;

Власова Е. В., к.м.н., заведующая отделением клинической иммунологии ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», Екатеринбург, Россия;

Дерябина С. С., к.б.н., заведующая лабораторией молекулярной диагностики ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка», Екатеринбург, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Синдром Ди-Джорджи является первичным иммунодефицитом из группы САТСН 22. Синдромы САТСН 22 (Cardiac defects, Abnormal facies, Thymic hypoplasia, Cleft palate, Hypocalcemia,  $del 22$ ) – заболевания, связанные с хромосомными аномалиями, затрагивающими 22 хромосому, и проявляющиеся врожденными пороками развития. Наиболее часто при этих заболеваниях на-

блюдается делеция района  $q11.2$  длинного плеча 22 хромосомы, возможны транслокации между участками 21 и 22 хромосом, транслокации 22p на 22q [1]. Фенотип синдрома Ди Джорджи также выявляется у больных с делецией 10p13-14, алкогольной и других фетопатиях. Частота САТСН-синдромов составляет 1:3000–6000 [2]. Помимо синдрома Ди Джорджи, в группу САТСН входят: синдром конотрункальных и лицевых аномалий и велокардиофациальный синдром. При конотрункальном и велокардиофациальном синдромах иммунологические нарушения отсутствуют или слабо выражены [1].

Клиническими проявлениями синдрома Ди-Джорджи являются: пороки сердца и крупных сосудов, гипоплазия парашитовидных желез, дефицит паратгормона, гипокальциемия, судороги, аплазия и гипоплазия тимуса, иммунологические нарушения, дефицит СТГ, аномалии лицевого скелета, строения гортани, глотки, трахеи, внутреннего уха, пищевода, зубов, пороки развития почек, аномалии ЖКТ и ЦНС,

задержка речевого и моторного развития, синдром гиперактивности, шизофрения [3, 4, 5].

При синдроме Ди-Джорджи иммунологические дефекты варьируют от полной аплазии тимуса с тяжелым инфекционным синдромом до практически нормальной функции иммунной системы. При наличии выраженного Т-клеточного дефицита возможны аутоиммунные и онкологические заболевания. При вовлечении иммунной системы чаще наблюдается снижение количества Т-лимфоцитов и их пролиферативной активности. Количество В-лимфоцитов и натуральных киллеров обычно в норме. Концентрация сывороточных Ig чаще нормальная, но у некоторых больных наблюдается селективный дефицит IgA, гипо- или агаммаглобулинемия [1].

**Целью** настоящей работы явилось клиническое, молекулярно-биологическое и иммунологическое обследование группы пациентов с синдромом Ди-Джорджи.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы 37 пациентов с синдромом Ди Джорджи в возрасте от 1 мес. до 36 лет. Все пациенты наблюдаются в отделении клинической иммунологии ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница» (ОДКБ). Проводился сбор анамнеза, в том числе – семейного, осмотр пациентов.

Молекулярно-генетические исследования проводили в лаборатории молекулярной диагностики ГБУЗ СО Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка». Геномную ДНК из сухих пятен крови и образцов цельной крови выделяли автоматическим методом на станции MagNa Pure LC2.0 (Roche, США). В работе использовали коммерческий набор MagNa Pure LC DNA Isolation Kit I (Roche, США) и протокол выделения DNA I Blood Cells High Performance protocol. Объем образцов для экстракции ДНК составил 200 мкл цельной крови, взятой в вакуумные пробирки (Sarstedt, Германия) с K3-ЭДТА или 2 стандартных сухих пятна крови с фильтровальной карточки, которые выбивались в пробирку «Эппендорф» ручным пробойником. Анализ критического участка 22q11 хромосомы 22 у детей с подозрением на синдром Ди Джорджи проводили методом мультиплексной лигазной амплификации проб (MLPA). Использован коммерческий набор SALSA MLPA probemix P250-B2 DiGeorge (MRC-Holland, The Netherlands), который содержит 48 различных MLPA-зондов, 29 из кото-

рых локализованы в хромосомном районе 22q11. Анализ образцов проводили согласно инструкции фирмы-производителя (MRC-Holland) на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (США). Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Sofalyser (MRC-Holland).

Иммунологическое обследование проводилось в клиничко-диагностической лаборатории ОДКБ. Кровь забирали в вакуумные пробирки (Sarstedt, Германия) с гепарином. Методом проточной цитометрии на проточном цитофлюориметре Navios (Beckman Coulter, США) с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, США) подсчитывали общее количество Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>), количество Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) и цитотоксических Т-клеток (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), натуральных киллеров (CD3<sup>-</sup>CD16/56<sup>+</sup>), В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>). Подсчет абсолютного количества клеток проводился с применением счетных частиц Flow-Count (Beckman Coulter, США). Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Navios Software (Beckman Coulter, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В отделении клинической иммунологии ОДКБ наблюдается 37 пациентов с синдромом Ди Джорджи, из них 34 ребенка и 3 взрослых. У большинства детей – 18 человек, диагноз был поставлен в возрасте до 6 мес., у 11 детей – в возрасте с 2 до 7 лет, у 8 пациентов – в возрасте 9–16 лет, взрослые являются родителями наших детей и были обследованы в возрасте 27–33 года (2 женщины, 1 мужчина). Нами наблюдаются три семьи, при этом в двух из них по два ребенка с синдромом Ди Джорджи. У всех взрослых определялись фенотипические признаки синдрома Ди Джорджи, но только у мужчины диагностирован врожденный порок сердца.

При молекулярно-генетическом обследовании у 33 из 34 пациентов детского возраста была выявлена микроделеция del22q11.2 (**Таб. 1**). Еще в одном случае диагноз был основан на совокупности фенотипических проявлений и пороков развития: врожденный порок сердца, расщелина твердого неба и трудности в обучении. Возраст выявления микроделеции del22q11.2 у детей варьировал от 0,5 мес до 15 лет, медиана возраста составила 29,5 месяцев. В исследовании встречались пациенты, которым правильный диагноз был установлен еще до рождения (семья отказалась от пренатальной диагности-

ки), или только через несколько лет после проведенного генетического исследования (отказ от взаимодействия с врачами). При проведении генетического исследования у родителей пациентов с del22q11.2 (n=13, 7 семей) у 3 взрослых обнаружены делеции в области региона Ди Джорджи, идентичные делеции, выявленной у их детей.

У 30 обследованных детей диагностирован врожденный порок сердца (**Таб. 1**), преимущественно: перерыв дуги аорты, тетрада Фалло, дефект межжелудочковой перегородки, дефект межпредсердной перегородки, у 22 детей проведены корректирующие операции. У 4 детей пороки сердца и сосудов не выявлены. Сочетание врожденного порока сердца с другими пороками диагностировано у 12 детей (**Таб. 1**). В большинстве случаев (5 детей), – это пороки опорно-двигательного аппарата в виде врожденной косолапости, серповидной деформации стоп, синдактилии. Пороки развития почек в виде гипоплазии и дистопии почек, гипоспадии выявлены у 4 пациентов, порок развития головного мозга – у 1 ребенка, трахеомалиация главного бронха – у 1 пациента.

У всех детей отмечался лицевой дисморфизм (**Таб. 1**) – монголоидный разрез глаз, широкая переносица, низкопосаженные уши, микрогнатия. Поражение носоглоточного аппарата выявлено у 13 больных, из них расщелины твердого и мягкого неба у 7 человек, тугоухость у 6 детей. У детей младшего возраста в большей степени была выражена задержка физического и речевого развития.

У всех детей были выявлены признаки нарушения противоинфекционной защиты (**Таб. 1**): наблюдались острые и хронические процессы вирусно-бактериальной этиологии различной локализации. Генерализованные бактериальные инфекции были характерны для детей раннего возраста в послеоперационном периоде коррекции врожденного порока сердца, при этом требовалось назначение антибактериальной, противогрибковой и иммуностропной терапии. У детей до 3-х лет ведущее место в структуре заболеваемости занимали заболевания респираторного тракта в виде повторных пневмоний, рецидивирующих бронхитов, риносинуситов. Дети школьного возраста болели редкими респираторными вирусными инфекциями, как

**Таблица 1.** Клинико-диагностические параметры у детей с синдромом Ди Джорджи (n=34)

Исследованный параметр	Количество детей с данным признаком	%
Наличие врожденного порока сердца	30	88
Сочетание врожденного порока сердца с другими пороками	12	35
Лицевой дисморфизм	34	100
Поражение носоглоточного аппарата	13	38
Нарушения противоинфекционной защиты	34	100
Гипокальциемия	9	26
Летальный исход	4	12
Наличие микроделеции del22q11.2	33	97
Снижение абсолютного количества Т-лимфоцитов (CD3 <sup>+</sup> ) по сравнению с возрастной нормой [11]	23	68
Снижение абсолютного количества Т-хелперов (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ) по сравнению с возрастной нормой [11]	22	65
Снижение абсолютного количества цитотоксических Т-клеток (CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ) по сравнению с возрастной нормой [11]	20	59
Снижение абсолютного количества натуральных киллеров (CD3 <sup>-</sup> CD16/56 <sup>+</sup> ) по сравнению с возрастной нормой [11]	5	15
Снижение абсолютного количества В-лимфоцитов (CD19 <sup>+</sup> ) по сравнению с возрастной нормой [11]	9	26

правило, не требовавшими назначения антибактериальной терапии. Гипокальциемия диагностирована у 9 детей (Таб. 1), при этом судороги отмечались у 3 детей. Летальные исходы констатированы у 4 детей: у 3 детей в раннем возрасте от генерализованного инфекционного процесса, у 1 ребенка – от гипокальциемического криза.

При оценке субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови, снижение абсолютного количества Т-клеток, Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток наблюдалось у двух третей обследованной группы детей (Таб. 1). Снижение количества В-лимфоцитов и натуральных киллеров выявлялось реже: лишь у 20% и 15% больных, соответственно. При этом, наибольшее число нарушений численности субпопуляций лимфоцитов зафиксировано у детей в возрасте до 1 года.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В целом, можно отметить, что у всех обследованных нами пациентов клинические проявления заболевания укладывались в классический симптомокомплекс синдрома Ди Джорджи [3, 4, 5]. Наиболее частыми признаками были лицевой дисморфизм и нарушения противомикробной защиты, которые наблюдались у всех пациентов детского возраста. Один из обследованных детей не имел делеции 22q11.2, однако фенотип синдрома Ди Джорджи могут иметь больные с делециями 10p13, 18q21.33, 4q21.3-q25 [6].

У подавляющего большинства обследованных нами детей выявлены врожденные пороки сердца. Считается, что данная патология является основной причиной смертности при синдромах делеции 22q11.2 [7]. Однако, среди детей в наблюдаемой нами группе в качестве причин летальности выступили инфекционный синдром и электролитные нарушения. При этом, более двух третей детей с пороками сердца были прооперированы. Это свидетельствует о своевременной диагностике и коррекции данной патологии.

У детей младшего возраста в обследованной нами группе более ярко проявлялась задержка физического и речевого развития, чем у более старших детей. Когнитивные нарушения, задержка психического развития и, как следствие, трудности в обучении часто определяются у детей школьного возраста с синдромом Ди Джорджи [8, 9].

Для синдрома Ди Джорджи характерно снижение как общего количества Т-лимфоцитов,

так и их субпопуляций: Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток, в большей степени эти изменения затрагивают наивные лимфоциты [10]. У двух третей обследованной нами группы наблюдалось снижение численности вышеперечисленных клеток по сравнению с возрастной нормой [11]. Считается, что у больных с редуцированным количеством Т-лимфоцитов и Т-хелперов повышен риск развития аутоиммунных заболеваний [12]. Однако у обследованных нами пациентов аутоиммунные проявления отсутствовали. Количество В-лимфоцитов было снижено только у четверти больных, натуральных киллеров – у 15% пациентов. Политературным данным, численность последних двух популяций при синдроме Ди Джорджи чаще сохраняется в пределах возрастных нормативных значений [1].

Таким образом, учитывая широкую гетерогенность наблюдаемых клинических проявлений синдрома Ди Джорджи, представляется важным дальнейшее накопление знаний о данном заболевании, с целью его более раннего распознавания у пациентов с «мягким» фенотипом. При этом возрастает роль сбора семейного анамнеза и своевременного проведения молекулярно-генетической верификации, а также раннего назначения терапии для существенного улучшения качества жизни и социальной адаптации пациентов с синдромом Ди Джорджи.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES

1. Иммунология детского возраста: практическое руководство по детским болезням, под ред. А. Ю. Щербины, Е. Д. Пашанова. Москва: Медпрактика-М. 2006. 432 с. [Immunology of childhood: practical guideline in children's diseases. Ed. Stcherbina A. Yu., Pashanov E. D. Moscow: Medpraktika-M. 2006. 432 p.]
2. Bassett A. S., McDonald-McGinn D. M., Devriendt K., Digilio M. C., Goldenberg P., Habel A., Marino B., Oskarsdottir S., Philip N., Sullivan K., Swillen A., Vorstman J. International 22q11.2 Deletion Syndrome Consortium. Practical guidelines for managing patients with 22q11.2 deletion syndrome. *J Pediatr.* 2011, 159(2):332–9.e1.
3. Кондратенко И. В., Бологов А. А. Первичные иммунодефициты. М.: Медпрактика-М. 2005. 321 с. [Kondratenko I. V., Bologov A. A. Primary immunodeficiency. Moscow: Medpraktika-M. 2005. 321 p.]
4. Румянцев А. Г., Масчан А. А. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению синдрома делеции 22-й хромосомы. М. 2014. 12с. [Rumyantsev A. G., Maschan A. A. Federal clinical recommendations on diagnostics and treatment of the syndrome of 22 chromosome deletion. Moscow. 2014. 12 p.]

5. Sgardioli I. C., Paoli Monteiro F., Fanti P., Paiva Vieira T., Gil-da-Silva-Lopes V. L. Testing criteria for 22q11.2 deletion syndrome: preliminary results of a low cost strategy for public health. *Orphanet J Rare Dis.* 2019, 14(1):123.
6. Швец О. В., Продеус А. П., Щербина А. Ю. Синдром делеции DEL 22q11.2 (синдром ДиДжорджи): клинические и иммунологические аспекты патологии. *Российский иммунологический журнал.* 2011, 5(14), 2, 101–111. [Shvets O. V., Prodeus A. P., Shcherbina A. Yu. Clinical and immunological aspects of DEL 22q11.2 syndrome (DiGeorge syndrome). *Russian Journal of Immunology.* 2011. 5(14), 2, 101–111.]
7. Намазова-Баранова Л. С., Гинтер О. В., Полунина Т. А., Давыдова И. В., Савостьянов К. В., Пушков А. А., Журкова Н. В., Мосьпан Т. Я. Синдром делеции 22q11.2: симптомы, диагностика, лечение. *Вопросы современной педиатрии.* 2016; 15 (6): 590–595. [Namazova-Baranova L. S., Ginter O. V., Polunin T. A., Davydova I. V., Savostyanov K. V., Pushkov A. A., Zhurkova N. V., Mospan T. Ya. Deletion syndrome 22q11.2: symptoms, diagnostics, treatment. *Questions of modern pediatrics.* 2016; 15 (6): 590–595.]
8. Jonas R. K., Montojo C. A., Bearden C. E. The 22q11.2 Deletion Syndrome as a Window Into Complex Neuropsychiatric Disorders Over the Lifespan. *Biol Psychiatry.* 2014, 75 (5), 351–360.
9. Genes D. G., Schaer M., Eliez S. Brain Development and Psychiatric Phenotypes in Velo-Cardio-Facial Syndrome. *Dev. Disabil. Res. Rev.* 2008, 14 (1), 59–68.
10. Klocperk A., Paračková Z., Bloomfield M., Rataj M., Pokorný J., Unger S., Warnatz K., Šedivá A. Follicular Helper T Cells in DiGeorge Syndrome. *Front Immunol.* 2018, 9:1730.
11. Tosato F., Bucciol G., Pantano G. Lymphocytes Subsets Reference Values in Childhood. *Cytometry Part A.* 2015, 87A, 81–85.
12. Giardino G., Radwan N., Koletsi P., Morrogh D. M., Adams S., Ip W., Worth A., Jones A., Meyer-Parsonson I., Gaspar H. B., Gilmour K., Davies E. G., Ladomenou F. Clinical and immunological features in a cohort of patients with partial DiGeorge syndrome followed at a single centre. *Blood.* 2019, pii: blood.2018885244.

## CLINICAL-LABORATORY CHARACTERISTIC OF PATIENTS WITH SYNDROME DIGEORGE

© 2019 I. A. Pashnina<sup>1\*</sup>, E. V. Vlasova<sup>1</sup>, S. S. Deryabina<sup>2</sup>

\*E-mail: irina\_pashnina@list.ru

<sup>1</sup>Regional Children's Clinical Hospital, Yekaterinburg, Russia;

<sup>2</sup>Medical Center "Health Care of Mother and Child", Yekaterinburg, Russia

**Received:** 21.05.2019. **Accepted:** 27.06.2019

Cases of children (n=34) and adults (n=3) with DiGeorge syndrome were investigated. In 33 of 34 children 22q11.2 deletion was revealed. In 30 children a cardiac malformation was diagnosed, in 12 cases – in combination with other congenital malformations, all children had face dysmorphisms. Young children had more severe physical and speech development delay. All children showed signs of anti-infectious protection disorders: acute and chronic viral and bacterial infections of different localization. Lethal outcomes were observed in four children: three of them – because of sepsis, one – because of hypocalcemic crisis. The decreased level of the T-cells, T-helpers and cytotoxic T-cells absolute count in peripheral blood was observed in 59–68% of children. The decreased count of B-lymphocytes and natural killers was detected less frequently: in 26% and 15% of patients, respectively.

*Key words:* primary immunodeficiency, syndrome DiGeorge, chromosomal anomalies, T-lymphocytes

### Authors:

**Pashnina I. A.**, ☒ PhD, Head of clinical diagnostics laboratory of Regional Children's Clinical Hospital, Yekaterinburg, Russia. Yekaterinburg, Regional Children's Clinical Hospital. Phone: +79226004686, **E-mail:** irina\_pashnina@list.ru;

**Vlasova E. V.**, PhD, Head of clinic immunology office of Regional Children's Clinical Hospital, Yekaterinburg, Russia;

**Deryabina S. S.**, PhD, Head of laboratory of molecular diagnostics of Medical Center "Health Care of Mother and Child", Yekaterinburg, Russia.

## УРОВЕНЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА 17 И ИНТЕРФЕРОНА $\gamma$ В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ АНТИТЕЛАМИ К CD3 И CD28 У ДЕТЕЙ С АРТРИТАМИ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ

© 2019 г. И. А. Пашнина\*, И. М. Криволапова

\*E-mail: [irina\\_pashnina@list.ru](mailto:irina_pashnina@list.ru)

ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница»,  
Екатеринбург, Россия

Поступила: 22.05.2019. Принята: 28.06.2019

Обследованы дети 2–17 лет с ювенильным идиопатическим артритом (n=100), неуточненной реактивной артропатией (n=15), а также 31 клинически здоровый ребенок (контроль). У детей в супернатантах культур цельной крови определяли концентрацию IL-17 и IFN $\gamma$  методом ИФА: в спонтанном варианте, при стимуляции антителами к CD3, антителами к CD3 и CD28. У детей с артритами различной этиологии спонтанный уровень IFN $\gamma$  был выше, чем в контроле, а при обоих вариантах стимуляции, напротив, — ниже. Спонтанная продукция IL-17 у больных не отличалась от таковой у здоровых детей, в условиях стимуляции синтез этого цитокина в группах с артритами был выше, чем в контроле.

**Ключевые слова:** ювенильный артрит, реактивная артропатия, цитокины

DOI: 10.31857/S102872210007262-3

Адрес: 620149 Екатеринбург, ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», Пашнина Ирина Александровна.  
Тел.: 8(343) 272-91-39; E-mail: [irina\\_pashnina@list.ru](mailto:irina_pashnina@list.ru)

**Авторы:**

**Пашнина И. А.**, д.б.н., заведующая клинико-диагностической лабораторией ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», Екатеринбург, Россия;

**Криволапова И. М.**, биолог клинико-диагностической лаборатории ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», Екатеринбург, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Цитокины (ЦК) участвуют во всех реакциях иммунной системы и регулируют функционирование всех иммунокомпетентных клеток [1]. Роль этих белков чрезвычайно высока как в физиологических условиях, так и при развитии различных патологических процессов, особенно — связанных с воспалением. Причем, в ряде случаев, возникновение патологии обусловлено именно нарушением цитокинового баланса [2, 3]. При чрезмерной выработке провоспалительных ЦК могут возникать аутовоспалительные заболевания [4].

Одним из наиболее распространенных среди детского населения аутоиммунно-аутовоспалительных заболеваний соединительной ткани является ювенильный идиопатический артрит (ЮИА) [5, 6]. Это разнородная группа заболеваний, включающая в себя несколько вариантов, различающихся по патогенетическим особенностям и симптоматике [5]. Близкими к ЮИА по клиническим проявлениям заболеваниями являются реактивные артропатии, развивающиеся в ответ на внесуставную инфекцию. Особую сложность для диагностики представляет группа неуточненных реактивных артропатий (нРеА), выделяемых в МКБ-10 при отсутствии хронологической связи артрита и инфекционного процесса [5].

При всех вариантах течения ЮИА, а также при артритах любой другой этиологии, развивается воспалительный процесс в суставах, несомненное участие в котором принимают различные ЦК. При этом, данные разных авторов относительно концентрации ЦК в сыворотке крови при ЮИА существенно отличаются друг

от друга [7, 8, 9]. Отчасти это может быть обусловлено сложностями измерения цитокинов в сыворотке крови, связанными с коротким временем жизни этих белков. Одним из подходов, позволяющих преодолеть указанный недостаток, является исследование продукции ЦК клетками периферической крови, культивируемых *in vitro*, в том числе – при добавлении различных стимуляторов [1].

В качестве стимуляторов при исследовании ЦК часто используют растительные митогены: фитогемагглютинин, конканавалин А, митоген лаконоса [1]. Однако возможно использование других стимуляторов, например, целенаправленное воздействие на клеточные рецепторы. Стимуляция Т-клеточного рецептора (ТКР) антителами к CD3 активирует клетки и, по некоторым представлениям, имитирует контакт Т-лимфоцитов с аутоантигенами и «фоновую» стимуляцию, необходимую для поддержания периферической толерантности. Комбинированная стимуляция антителами к CD3 и к корецепторной молекуле CD28 моделирует ситуацию контакта наивных Т-лимфоцитов с чужеродными антигенами, представленными антигенпрезентирующими клетками [10]. На изолированную стимуляцию через ТКР в большей степени способны отвечать активированные Т-лимфоциты, что подтверждается потерей ими способности экспрессировать CD28 [11].

**Целью** работы явилась оценка концентрации IL-17 и IFN $\gamma$  в супернатантах клеточных культур у детей с ювенильным идиопатическим артритом и неуточненной реактивной артропатией при стимуляции антителами к CD3 и к CD3/CD28 в сравнении со здоровыми детьми.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы дети в возрасте от 2 до 17 лет с ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА, n=100), с недифференцированной реактивной артропатией (нРеА, n=15), условно здоровые дети без признаков аутоиммунных и аллергических заболеваний (контроль, n=31). Средний возраст в группах составил 8,4; 9,0 и 8,7 лет, соответственно. Диагноз ЮИА устанавливался на основании критериев ILAR (Международной лиги ревматологических ассоциаций второго пересмотра в Edmonton, 2001), диагноз нРеА – в соответствии с диагностическими критериями, принятыми на Международном совещании по Реактивным артритам в Берлине в 1996 г. Все дети были серонегативны по ревматоидному фактору.

Группу с ЮИА составили дети с различными его вариантами: олигоартикулярный вариант (n=52); полиартикулярный вариант (n=21); системный вариант (n=9); артрит, ассоциированный с энтезитом (n=17). На момент обследования все дети не имели острых или хронических инфекционных заболеваний. Больные с ЮИА и нРеА получали патогенетическую и симптоматическую терапию в соответствии с существующими стандартами лечения.

Для определения уровня цитокинов кровь забиралась в вакуумные гепаринизированные пробирки. Образцы крови разводили глутаминсодержащей средой RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), в соотношении 1:9, готовили серию из 3 образцов с конечным объемом 500 мкл: контрольный образец без стимулятора; образец, стимулированный агонистическими антителами к CD3 (aCD3, Биокон, Россия), в конечной концентрации 2 мкг/мл; образец, стимулированный агонистическими антителами к CD3 (Биокон, Россия), в конечной концентрации 2 мкг/мл и агонистическими антителами к CD28 в конечной концентрации 0,8 мкг/мл (aCD28, Beckman Coulter, США). Образцы инкубировали в течение 24 часов (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). После инкубации разведенную кровь центрифугировали 10 мин. при 1500 об/мин и отбирали по 400 мкл супернатантов. Определение концентрации IL-17 и IFN $\gamma$  в супернатантах клеточных культур проводилось методом ИФА (Вектор-Бест, Россия). Статистическая обработка выполнена с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни в рамках программного обеспечения Statistica для Windows (версия 6.0) и Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании спонтанной и стимулированной продукции цитокинов у детей с различными вариантами ЮИА не было выявлено различий между группами. На этом основании, дальнейшие исследования проводились в объединенной группе пациентов с ЮИА.

Спонтанный синтез IL-17 и IFN $\gamma$  клетками крови, как больных, так и здоровых детей был невелик (**Таб. 1**). При этом концентрация IL-17 у всех пациентов была практически нулевой и не различалась между группами. Спонтанная концентрация IFN $\gamma$  у детей с артритами была существенно выше, чем у здоровых детей. Изолированная стимуляция через ТКР и сочетанная (через ТКР и корецептор CD28), во всех случаях приводила к значительной активации выра-

**Таблица 1.** Концентрация IL-17 и IFN $\gamma$  в супернатантах культур цельной крови у детей с артритами различной этиологии и у здоровых детей.

ЦК	Условия инкубации	Группа		
		Контроль	ЮИА	нРеА
IL-17	Без стимулятора	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,6)	0,0 (0,0–0,25)
	aCD3	10,0 (1,0–16,5)	17,0 (5,0–34,0)***	26,0 (9,0–44,5)**
	aCD3/aCD28	4,0 (1,5–14,0)	18,0 (5,0–38,0)***	29,5 (12,0–39,5)***
IFN $\gamma$	Без стимулятора	0,0 (0,0–4,0)	1,0 (0,0–47,0)*	10,0 (0,0–46,0)*
	aCD3	1075,0 (187,0–1561,0)	136,0 (92,0–274,0)***	134,0 (60,0–197,0)***
	aCD3/aCD28	926,0 (351,0–1591,0)	197,0 (116,0–402,0)***	170,0 (83,0–252,0)***

**Примечание:** Данные представлены в виде: Медиана (Нижняя квартиль – Верхняя квартиль); различия с контролем: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$

ботки ЦК Т-лимфоцитами по сравнению с соответствующим спонтанным уровнем ( $p < 0,01$ ). Однако уровень такой активации в исследованных группах был различен (Таб. 1). Концентрация IL-17 в супернатантах клеточных культур при обоих вариантах стимуляции у детей с артритами различной этиологии была выше, чем у здоровых детей. Стимулированный синтез IFN $\gamma$  у больных с ЮИА и нРеА, напротив, был менее интенсивным, чем в контрольной группе. Между группами с артритами различия не выявлены ни по одному из параметров.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Увеличение выработки IL-17 и IFN $\gamma$  в ответ на различные варианты стимуляции Т-клеточного рецептора, является закономерным, т.к. оба исследованных цитокина, в основном, продуцируются Т-лимфоцитами. Синтез IFN $\gamma$  осуществляют преимущественно Т-хелперы 1-го типа, этот цитокин активирует макрофаги, нейтрофилы и натуральные киллеры, влияет на дифференцировку Т- и В-лимфоцитов, усиливает цитотоксическое действие Т-лимфоцитов и натуральных киллеров [1]. IL-17 синтезируется Т-хелперами 17 типа, участвует в развитии ранней стадии воспаления, стимулирует фибробласты; продукцию различных провоспалительных ЦК: IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ; синтез металлопротеиназ и других ферментов [1, 12].

IL-17 играет роль в развитии воспалительного процесса в синовиальной оболочке [13, 14]. У детей с ЮИА уровни IL-17 в сыворотке крови были значительно выше, чем у здоровых детей [15]. Имеются данные, что у больных с ЮИА [16] уровень сывороточного IL-17 коррелировал с клиническими параметрами активности заболева-

ния. Данные о роли IFN $\gamma$  в развитии синовита достаточно противоречивы. С одной стороны, внесение этого цитокина в смешанную культуру Т-клеток и моноцитов пациентов с ревматоидным артритом приводило к стимуляции синтеза TNF- $\alpha$  [17]. С другой стороны, IFN $\gamma$  способен снижать продукцию IL-1, матриксных металлопротеиназ и пролиферацию синовиоцитов при ревматоидном артрите [18].

Обращает на себя внимание, что выработка IL-17 у пациентов с артритами при обоих вариантах стимуляции была выше, чем у клинически здоровых детей, а синтез IFN $\gamma$ , напротив, – ниже. Возможно, это свидетельствует о большей патогенетической значимости IL-17 для развития воспалительных заболеваний суставов. Как уже говорилось выше, IFN $\gamma$  способен подавлять некоторые воспалительные иммунологические реакции при артрите. Возможно, его сниженная при стимуляции выработка *in vitro* отражает дефицит этого цитокина в условиях *in vivo*.

Другим дополнительным фактором, обуславливающим более низкий уровень стимулированной выработки IFN $\gamma$  у детей с ЮИА и нРеА, может быть истощение функциональных резервов клеток-продуцентов в условиях хронического воспаления и постоянной активации. Особенно, если учесть, что спонтанный уровень этого ЦК был повышен в обеих группах с артритами. В наших более ранних работах было установлено, что увеличение количества Т-лимфоцитов, экспрессировавших ранние активационные маркеры CD25, CD38 и CD69, у больных с ЮИА было существенно слабее, чем у здоровых детей, как в ответ на индукцию фитогемагглютинином, так и на индукцию антителами к CD3 и CD28 [19, 20]. Соответственно, снижение резервных возмож-

ностей лимфоцитов может проявляться как «дефицит активации» в ответ на стимуляцию и затрагивать разные аспекты функционирования клеток: синтез цитокинов, экспрессию активационных молекул и т.д. Кроме того, нами ранее выявлено, что при стимуляции фитогемагглютинином синтез IFN $\gamma$  у детей с артритами также был ниже, чем в контрольной группе, при этом стимулированные концентрации IL-17 в исследованных группах не различались [21]. Соответственно, стимуляция позволяет выявить особенности продукции ЦК, которые не проявляются при исследовании их спонтанного синтеза. Причем, клетки крови здоровых и больных детей по разному отвечают на разные стимуляторы.

Таким образом, у детей с артритами различной этиологии спонтанный уровень IFN $\gamma$  был выше, чем в контроле, а при стимуляции через T-клеточный рецептор и корецептор CD28, напротив, – ниже. Спонтанная продукция IL-17 у больных с ЮИА и нРеА не отличалась от таковой у здоровых детей, в условиях стимуляции синтез этого цитокина в группах с артритами был выше, чем в контроле. Учитывая этот факт, а также результаты наших ранее опубликованных работ, можно заключить, что воздействие стимуляторов *in vitro* позволяет выявлять различия в реактивности иммунокомпетентных клеток больных и здоровых, что может способствовать более углубленному пониманию особенностей функционирования иммунной системы при различных заболеваниях.

Авторы искренне благодарят врачей Областной детской клинической больницы (г. Екатеринбург) Козлову Е. С. и Скоробогатову О. В. за подбор пациентов для исследования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES

1. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство: в 2 т. / под ред. В. В. Долгова, В. В. Меньшикова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 808 с. [Clinical laboratory diagnosis: national guideline: in 2 t. Ed. V.V. Dolgov. Moscow: GEOTAR-Media, 2012, 808 p].
2. Сибирцев А. С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека. Медицинский академический журнал 2013, 13 (3), 18–41. [Simbirtsev A. S. Cytokines in the pathogenesis of infectious and non-infectious human diseases. Medical Academic Journal 2013, 13 (3), 18–41].
3. Журавлева Ю. А., Соломатина Л. В., Гусев Е. Ю. Особенности цитокинемии при различных аутоиммунных заболеваниях. Российский иммунологический журнал 2017, 11 (20), (2), 315–316. [Zhuravleva Yu. A., Solomatina L. V., Gusev Ye. Yu. Characteristics of cytokinemia in various autoimmune diseases. Russian Journal of Immunology 2017, 11 (20), (2), 315–316].
4. Гамторно М. Аутовоспалительные заболевания у детей. Вопросы современной педиатрии 2014, 13 (2), 55–64. [Gottorno M. Auto-inflammatory diseases in children. Questions of modern pediatrics 2014, 13 (2), 55–64].
5. Алексеева Е. И., Литвицкий П. Ф. Ювенильный ревматоидный артрит: этиология, патогенез, клиника, алгоритмы диагностики и лечения, под ред. А. А. Баранова. М.: ВЕДИ. 2007. 368 с. [Alekseva E. I., Litvitskiy P. F. Juvenile rheumatoid arthritis: etiology, pathogenesis, clinic, algorithms of diagnostics and treatment. Ed. A. A. Baranov. Moscow: VEDI. 2007. 368 p].
6. Rypdal V., Arnstad E. D., Aalto K., Bertson L., Ekelund M., Fasth A., Glerup M., Herlin T., Nielsen S., Peltoniemi S., Zak M., Rygg M., Rypdal M., Nordal E. Predicting unfavorable long-term outcome in juvenile idiopathic arthritis: results from the Nordic cohort study. Arthritis Research & Therapy, 2018, 20:91.
7. Gorska A., Kowal-Bielecka O., Urban M., Pietrewicz E. Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels in the serum and synovial fluid in relation to bone mineral density and turnover in children with juvenile idiopathic arthritis. Eur. J. Immunology 2008, 33 (4), 216–219.
8. Pietrewicz E., Urban M., Górska A. Cytokine levels in serum of patients with juvenile idiopathic arthritis depending on subtype and disease activity. Pol. Merkur. Lekarski 2004, 17 (99), 232–234.
9. Yilmaz M., Kendirli S. G., Altuntas D., Bing G., Antmen B. Cytokine levels in serum of patients with juvenile rheumatoid arthritis. Clinical Rheumatology 2001, 20 (1), 30–35.
10. Kohler K., Ganser A., Andre T., Roth G., Grosse-Hovest L., Jung G., Brock R. Stimulus dependence of the action of small-molecule inhibitors in the CD3/CD28 signalling network. Chem. Med. Chem. 2008, 3 (9), 1404–1411.
11. Trimble L. A., Shankar P., Patterson M., Daily J. P., Lieberman J. Human Immunodeficiency Virus-Specific Circulating CD8 T Lymphocytes Have Down-Modulated CD3 and CD28, Key Signaling Molecules for T-Cell Activation. Journal Of Virology 2000, 74, 16, 7320–7330.
12. Agarwal S., Misra R., Aggarwal A. Interleukin 17 levels are increased in juvenile idiopathic arthritis synovial fluid and induce synovial fibroblasts to produce proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. J Rheumatol. 2008, 35 (3), 515–519.
13. Beringer A., Noack M., Miossec P. IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting. Trends Mol. Med. 2016, 22 (3), 230–241.
14. Chen K., Kolls J. K. Interleukin-17A (IL17A). Gene 2017, 30 (614), 8–14.
15. Szymańska-Kałuża J., Cebula-Obrzut B., Smolewski P., Stanczyk J., Smolewska E. Imbalance of Th17 and T-regulatory cells in peripheral blood and synovial fluid in treatment naïve children with juvenile idiopathic arthritis. Central European Journal of Immunology 2014, 39 (1), 71–76.

16. *Vijatov-Djuric G., Doronjski A., Mitic I. Brkic S., Barisic N.* Interleukin-17A Levels Increase in Serum of Children With Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arch Rheumatol.* 2017, 32 (10), 1–10.
17. *Sebbag M., Parry S. L., Brennan F. M., Feldmann M.* Cytokine stimulation of T lymphocytes regulates their capacity to induce monocyte production of tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-10: possible relevance to pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 1997, 27 (3), 624–632.
18. *Moller B., Paulukat J., Nold M., Behrens M., Kukoc-Zivojnov N., Kaltwasser J. P., Pfeilschifter J., Mühl H.* Interferon- $\gamma$  induces expression of interleukin-18 binding protein in fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology* 2003, 42 (3), 442–445.
19. *Пашнина И. А.* Спонтанная и стимулированная фитогемагглютинином экспрессия маркеров активации CD25, CD38 и CD69 Т-лимфоцитами при заболеваниях различной этиологии у детей. *Российский иммунологический журнал* 2017, 11 (20), (3), 465–467. [*Pashnina I. A.* Spontaneous and phytohemagglutinin-stimulated expression of activation markers CD25, CD38 and CD69 on T-lymphocytes in children with different pathology. *Russian Journal of Immunology* 2017, 11 (20), (3), 465–467].
20. *Пашнина И. А.* Экспрессия CD69 на Т-лимфоцитах у детей с аутоиммунными заболеваниями при стимуляции через Т-клеточный рецептор или через Т-клеточный рецептор и ко-рецепторную молекулу CD28. *Российский иммунологический журнал* 2014, 8 (17), (3), 579–581. [*Pashnina I. A.* CD69 expression on T-lymphocytes in children with autoimmune diseases under stimulation through the T-cell receptor ore through T-cell receptor and the co-receptor CD28. *Russian Journal of Immunology* 2014, 8 (17), (3), 579–581].
21. *Криволапова И. М., Пашнина И. А., Черешнев В. А.* Уровень провоспалительных цитокинов в супернатантах культур цельной крови у детей с ювенильным идиопатическим артритом. *Вестник Уральской медицинской академической науки* 2018, 15 (3), 421–431. [*Krivolapova I. M., Pashnina I. A., Chereshev V. A.* The level of proinflammatory cytokines in cells cultures supernatants in children with juvenile idiopathic arthritis. *Bulletin of the Ural Medical Academic Science* 2018, 15 (3), 421–431].

## THE LEVEL OF INTERLEUKIN17 AND INTERFERON $\gamma$ IN CELL'S CULTURES SUPERNATANTS UNDER STIMULATION BY ANTIBODIES TO CD3 AND CD28 IN CHILDREN WITH ARTHRITIS OF DIFFERENT ETIOLOGY

© 2019 I. A. Pashnina\*, I. M. Krivolapova

\*E-mail: [irina\\_pashnina@list.ru](mailto:irina_pashnina@list.ru)

*Regional Children's Clinical Hospital, Yekaterinburg, Russia*

**Received:** 22.05.2019. **Accepted:** 28.06.2019

Children of 2–17 years old with juvenile idiopathic arthritis (n = 100), unspecified reactive arthropathy (n = 15) and 31 healthy children (controls) were examined. The spontaneous, anti-CD3-stimulated and anti-CD3/CD28-stimulated concentrations of IL-17 and IFN- $\gamma$  in the cells cultures supernatants were determined by ELISA. The spontaneous IFN- $\gamma$  level in children with arthritis of various etiologies was higher than in control, while the IFN- $\gamma$  concentrations in both variants of stimulation in the patients were lower. The spontaneous IL-17 production in the patients and in healthy children was the same, while stimulated synthesis of IL-17 in the groups with arthritis was higher than in the control group.

*Key words:* juvenile idiopathic arthritis, reactive arthritis, cytokines

### Authors:

**Pashnina I. A.**,  PhD, Head of clinical diagnostics laboratory of Regional Children's Clinical Hospital, Yekaterinburg, Russia. Yekaterinburg, Regional Children's Clinical Hospital. Phone: +79226004686, **E-mail:** [irina\\_pashnina@list.ru](mailto:irina_pashnina@list.ru);

**Krivolapova I. M.**, biologist of clinical diagnostics laboratory of Regional Children's Clinical Hospital, Yekaterinburg, Russia.

## УЧАСТИЕ ПЛАЗМЫ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ СЕТЕЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫМИ ГРАНУЛОЦИТАМИ

© 2019 г. А. Ю. Савочкина\*, О. С. Абрамовских, Э. Н. Мякишева,  
К. А. Абрамовских

\*E-mail: [alina7423@mail.ru](mailto:alina7423@mail.ru)

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации. Научно-исследовательский  
институт иммунологии ЮУГМУ, Челябинск, Россия

Поступила: 26.05.2019. Принята: 29.06.2019

Беременность является уникальным феноменом «мирного сосуществования» материнского организма и полуаллогенного плода. Для обеспечения жизнедеятельности, роста, развития эмбриона и плода в организме будущей матери происходят существенные изменения, которые касаются практически всех систем организма, в том числе иммунной системы и системы гемостаза. В работе представлены результаты оценки способности нейтрофилов к формированию NETs в I триместре беременности.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, беременность, гемостаз, нейтрофильные внеклеточные ловушки

DOI: 10.31857/S102872210007263-4

**Адрес:** Челябинск, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Савочкина Альбина Юрьевна. Тел.: +79127725806.

**E-mail:** [alina7423@mail.ru](mailto:alina7423@mail.ru)

**Авторы:**

**Савочкина А. Ю.**, д.м.н., доцент, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия;

**Абрамовских О. С.**, д.м.н., доцент, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия;

**Мякишева Э. Н.**, соискатель ученой степени кандидата биологических наук кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия;

**Абрамовских К. А.**, студентка 5 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

С позиции иммунологии репродукции, беременность представляет собой физиологически обусловленное состояние толерантности иммунной системы матери к генетически чужеродному плоду. Иммунная толерантность основана на согласованных действиях гормонов и цитокинов, а также взаимодействие между врожденными и адаптивными иммунными клетками [1]. Традиционно большинство исследований, изучающих присутствие и действие иммунных клеток в плаценте, касались врожденных иммунных эффекторных клеток, таких как децидуальные НК-клетки (dNK), макрофаги, дендритные клетки или более поздние регуляторные Т-клетки (Treg) [2, 3]. Новые данные показывают, что нейтрофилы также играют важную роль в поддержании нормальной беременности. Однако данные разных авторов весьма противоречивы. Согласно одним авторам, функциональная активность нейтрофилов при беременности снижена [4], в частности, снижена способность нейтрофилов к хемотаксису. Это снижение рассматривается

авторами как часть материнской иммуносупрессии, которая имеет важное значение для защиты полуаллогенного плода. Однако другие авторы утверждают, что функциональная активность нейтрофилов при беременности, наоборот, возрастает [5, 6, 7, 8]. В. И. Циркин с соавт. также установили, что физиологически протекающая беременность связана с фенотипическими и метаболическими изменениями гранулоцитов и моноцитов, которые подобны тем, что возникают при инфекции, но менее выражены. Все эти исследования подтверждают представление ряда авторов о том, что при физиологической беременности активность врожденного (неспецифического) иммунитета возрастает и тем самым повышает устойчивость матери и плода к возбудителям инфекции и беременность рассматривается как своеобразное системное воспаление, в котором нейтрофилы играют одно из ведущих мест [5, 6, 7, 8].

С наступлением беременности естественным изменениям подвергается и система гемостаза, при котором происходит увеличение уровня большинства факторов свертывания, снижения количества естественных антикоагулянтов и ингибирование фибринолиза [9]. При этом повышается уровень факторов XII, X, IX, VIII, V, VII, фактор Виллебарнда, фибриноген [10]. Фибринолитическая способность снижается во время беременности, главным образом, из-за заметно повышенного уровня ингибитора активатора плазминогена-1 (РАI-1) из эндотелиальных клеток и ингибитора-активатора плазминогена-2 (РАI-2) из плаценты [11]. Также происходит повышение функциональной активности тромбоцитов при некотором снижении их количества [9]. Эти изменения увеличиваются с прогрессированием беременности и носят компенсаторно-приспособительный характер. Баланс между прокоагулянтным и антикоагулянтным звеньями гемостаза играет важную роль для имплантации и развития формирующейся плаценты. Однако, низкое давление и замедленная скорость кровотока, характерные для плацентарной циркуляции, в сочетании с гиперкоагуляцией при беременности создает условия, предрасполагающие к тромбозу [12]. В связи с этим перед исследователями и практическими врачами встает необходимость изучения механизмов, при которых происходит нарушение баланса системы гемостаза и какие воздействия являются ключевыми для инициации каскада свертывания крови.

Исследования последних лет говорят о значительном участии нейтрофилов в нарушении в системе гемостаза, в том числе и при осложнениях, возникающих при беременности [13, 14]. В частности, структуры на основе хроматина, называемые внеклеточными ловушками нейтрофилов (NETs), играют ключевую роль в активации каскада коагуляции, активации тромбоцитов и служат в качестве основы для формирования тромба [15]. Нити ДНК сетей нейтрофильных гранулоцитов могут являться стимулом для контактной активации свертывающей системы [16, 17, 18]. Отрицательно-заряженная поверхность NETs, способна активировать фактор XII. Коагуляционный фактор XII, плазменная сериновая протеаза, активирующая фактор XI и прекаликреин, является традиционным инициатором «внутреннего пути» свертывания [19]. Кроме того, работы Fuchs et al. указывают на то, что отрицательно-заряженная поверхность NETs может также связываться с такими белками плазмы как фибриноген, фибронектин и фактор фон Виллебарнда (VWF), тем самым стабилизируя сгусток [20].

В связи с тем, что беременность сопровождается увеличением массы циркулирующей крови (гиперволемиа), повышением коагуляционного потенциала плазмы, замедлением скорости маточно-плацентарного кровотока, а также изменениями гормонального фона, актуальным на сегодняшний день остается изучение активности нейтрофилов и факторов способствующих образованию NETs во время беременности.

Была сформулирована **цель**: оценить влияние плазмы беременных и небеременных женщин на процессе формирования внеклеточных сетей нейтрофилами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования была периферическая кровь 12 условно здоровых женщин и 12 беременных женщин в I триместре (средний срок гестации 7 недель) без нарушений показателей гемостаза, в возрасте от 18–40 лет. Критериями включения в исследование для здоровых небеременных женщин являлись: первая фаза менструального цикла; отсутствие приема лекарственных препаратов; хронических заболеваний в стадии обострения. Критериями включения беременных женщин являлись: I триместр беременности, отсутствие акушерско-гинекологической патологии, отсутствие тромботических осложнений, которые оценивались врачом

акушером-гинекологом на основании общеклинических и лабораторных данных. Добровольное согласие на обследование получено от всех участников.

Проведена оценка системы гемостаза на автоматическом коагулометре STA Compact Max ("Diagnostica Stago", Франция). Определяли такие параметры гемостазиограммы как ПВ (протромбиновое время), АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время), тромбиновое время, уровни фибриногена и антитромбина III. Для количественного определения в плазме крови растворимых фибринмономерных комплексов (РФМК) мануальным методом использовали реагенты РФМК-тест (ООО Технология стандарт, Россия). Для исследования фибринолитической системы использовали тесты: эуглобулиновый лизис и XIIa-зависимый лизис (тест-системы ООО Технология стандарт, Россия). Функциональное состояние тромбоцитов оценивали при помощи 4-канального лазерного анализатора «Viola-230LA» (ООО НПФ «Биола», Россия) методом световой агрегометрии. Исследовалась спонтанная и индуцированная агрегация с использованием индукторов агрегации АДФ (ООО «Технология-стандарт», Россия) в концентрации 5,0 мкмоль, адреналин (ООО «Технология-стандарт», Россия), коллаген (ООО «Технология-стандарт», Россия).

Оценку способности нейтрофилов к формированию внеклеточных сетей проводилось по методу И. И. Долгушина и соавт. [21]. Для этого нами были сформированы 4 экспериментальные группы: 1 группа (К-) – к нейтрофилам, выделенным из периферической крови, добав-

ляли физиологический раствор; 2 группа (К+) – к нейтрофилам, выделенным из периферической крови, добавляли активатор форбол-12-мири- стат-13-ацетат (ФМА); 3 группа – к нейтрофилам, выделенным из периферической крови, добавляли активатор форбол-12-мири- стат-13-ацетат и плазму здоровых небеременных женщин; 4 группа – к нейтрофилам, выделенным из периферической крови, добавляли активатор форбол-12-мири- стат-13-ацетат и плазму беременных женщин I триместра. Далее все пробы инкубировали *in vitro* в течение 30 минут при температуре 37 °С. Материал наносили на предметное стекло, высушивали, фиксировали 96% этиловым спиртом и мазок окрашивали по Романовскому-Гимзе. Оценивалось соотношение морфологических форм нейтрофилов и число NETs. Данные анализировались с применением непараметрического метода U-критерий Манна-Уитни для расчета уровня значимости.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты соотношения морфологических форм нейтрофильных гранулоцитов и количества NETs при взаимодействии плазмы здоровых небеременных и беременных женщин представлены в **Таблице 1**. Морфологические формы интактных нейтрофилов достоверно отличаются от нейтрофилов, активированных ФМА. При добавлении к активированным нейтрофилам плазмы небеременных женщин и плазмы беременных женщин регистрируется снижение образования НВЛ, что дает основание утверждать о наличии в плазме факторов, подавляю-

**Таблица 1.** Морфологические формы интактных и активированных нейтрофилов при их совместной инкубации с ФМА и плазмы здоровых женщин, плазмы беременных женщин (n = 12, M ± m)

Группы	Морфологические формы нейтрофилов, %		
	Нейтрофилы с сегментированным ядром	Нейтрофилы с недифференцированным ядром	Нейтрофильные внеклеточные ловушки
Нейтрофилы + физ.р-р (К-) (1 группа)	90,41±1,18	6,16±0,93	3,41±0,35
Нейтрофилы + ФМА (К+) (2 группа)	57,66±1,75*	20,5±1,68*	21,75±0,50*
Нейтрофилы + ФМА + плазма небеременных женщин (3 группа)	90,66±1,38**	6,66±0,91**	3,33±0,46**
Нейтрофилы + ФМА+ плазма беременных женщин I триместра (4 группа)	63,08±3,72**/**	23,75±3,26***	12,91±1,28**/**

**Примечание:** p<0.05; \* – достоверное отличие морфологических форм нейтрофилов при сравнении групп 1 и 2; \*\*-достоверное отличие морфологических форм нейтрофилов при сравнении группы 2 с группами 3 и 4; \*\*\*- достоверное отличие морфологических форм нейтрофилов при сравнении групп 3 и 4

ших формирование внеклеточных сетей. Однако привлекает внимание тот факт, что влияние плазмы крови небеременных женщин на нейтрофилы, выделенные из периферической крови, полностью инактивирует выброс внеклеточной ДНК нейтрофилами, несмотря на действие активатора. Плазма, полученная от беременных женщин, при взаимодействии с нейтрофилами также приводит к снижению формирования внеклеточных сетей данными клетками, но показатель достоверно выше, в сравнении с действием плазмы полученной от небеременных женщин. Возможно, это связано с тем, что в период беременности изменяется гормональный фон женщины – продукция многих гормонов возрастает и появляются гормоны, ранее не синтезируемые в организме женщины, вследствие чего образуются новые взаимосвязи иммунно-гормональной регуляции.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Arck P.C., Hecher K. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nature Medicine* vol.19, 2013, 548–556
2. Schumacher M., Mattern C., Ghomari A., Oudinet J., Liere P., Labombarda F. Revisiting the roles of progesterone and allpregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors // *Prog Neurobiol.* 2014; V. 113, 6–39.
3. Rätsep M., Felker A., Kay V., Toluoso L., Hofmann A., & Croy B. (2015). Uterine natural killer cells: supervisors of vasculature construction in early decidua basalis, *REPRODUCTION*, 149(2),91–102.
4. Lampé R, et al. Phagocytic index of neutrophil granulocytes and monocytes in healthy and preeclamptic pregnancy. *Reprod Immunol.* 2015.
5. Циркин В.И., Анисимов К.Ю., Полежаева Т.В., Зайцева О.О., Худяков А.Н., Соломина О.Н., Хлыбова С.В., Дмитриева С.Л., Попова В.С. Роль нейтрофилов при физиологическом течении беременности, родов и ряде акушерских осложнений // *Вестник уральской медицинской академической науки.* 2015. № 4, 75–86. [Tsirkin V.I., Anisimov K.Yu., Polezhaeva T.V., Zaitseva O.O., Khudyakov A.N., Solomina O.N., Khlybova S.V, Dmitrieva S.L., Popova V.S. The role of neutrophils in the physiological course of pregnancy, childbirth and a number of obstetric complications // *Bulletin of the Ural Medical Academic Science.* 2015. № 4, 75–86.]
6. Luppi P., Haluszczak C., Betters D., Richard C., Trusco M., DeLoia J. Monocytes are progressively activated in the circulation of pregnant women. // *J Leukoc Biol.* 2002; V. 72, № 5, 874–884.
7. Худяков А.Н., Зайцева О.О., Соломина О.Н. Изучение эстрогенореактивности нейтрофилов крови женщин на разных сроках беременности и при угрозе преждевременных родов // *Вопросы фундаментальной и прикладной физиологии в исследованиях студентов вузов: Материалы VII всероссийской молодежной научной конференции.* Киров: ВятГГУ, 2015, 166–169. [Khudyakov A. N., Zaitseva O. O., Solomina O. N. Study of the estrogen reactivity of the blood neutrophils of women at different stages of pregnancy and with the threat of preterm labor // *Questions of fundamental and applied physiology in research of university students: Proceedings of the VII All-Russian Youth Scientific Conference.* Kirov: VyatGGU, 2015,166–169.]
8. Naccasha N., Gervasi M., Chaiworapongsa T., Berman S., Yoon B., Maymon E., Romero R. Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in normal pregnancy and maternal infection. // *Am J Obstet Gynecol.* 2001; V. 185, № 5, 1118–1123.
9. P. Thornton, J. Douglas. Coagulation in pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2010, Volume 24, Issue 3, 339–352
10. Simioni P. Thrombophilia and gestational VTE // *Thromb. Res.* – 2009. – Vol.123, Suppl.2,41–44.
11. Hellgren M. «Hemostasis during Normal Pregnancy and Puerperium» *Semin Thromb Hemost.* 2003; 29, 125–130.
12. Kujovich J. L. «Thrombophilia and pregnancy complications» // *Am J. Obstet. Gynecol.* 2004. Vol.191, 412–424.
13. Mizugishi K., Yamashita K. Neutrophil extracellular traps are critical for pregnancy loss in sphingosine kinase-deficient mice on 129Sv/C57BL/6 background. *FASEB J.* Vol.31 (12) 2017
14. Gupta A.K., Hasler P., Holzgreve W., Gebhardt S., Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum. Immunol.* 2005, 66,1146–1154.
15. Rao A. N., Kazzaz N. M., Knight J. S. Do neutrophil extracellular traps contribute to the heightened risk of thrombosis in inflammatory diseases? *World Journal of Cardiology.* 2015; 7(12), 829–842.
16. Von Brühl M.-L., Stark K., Steinhart A., et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *The Journal of Experimental Medicine.* 2012;209(4),819–835.
17. Pfeiler S., Massberg S., Engelmann B. Biological basis and pathological relevance of microvascular thrombosis. *Thromb Res* 2014;133(1),35–37;
18. Лунец Е.Н., Атауллаханов Ф.И., Пантелеев М.А. Интегральные лабораторные тесты гемостаза в диагностике гиперкоагуляции и оценке риска тромбоза // *Онкогематология* № 3 т. 10 2015, 73–77. [Lipets E. N., Ataulkhanov F. I., Panteleev M. A. Integral laboratory tests of hemostasis in the diagnosis of hypercoagulation and assessment of the risk of thrombosis // *Oncohematology* № 3, vol.10 2015,73–77]
19. Rao A. N., Kazzaz N. M., Knight J. S. Do neutrophil extracellular traps contribute to the heightened risk of thrombosis in inflammatory diseases? *World Journal of Cardiology.* 2015; 7(12), 829–842.
20. Fuchs T.A., Brill A., Duerschmied D., et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the USA. 2010; 107(36), 15880–15885.
21. Долгушин И. И. Методы обнаружения нейтрофильных ловушек / И. И. Долгушин, Ю. С. Шишкова, А. Ю. Савочкина // Аллергология и иммунология. – 2009. – Т. 10, № 3. – С. 458–462. [Dolgushin I. I. Methods for detecting neutrophilic traps / I. I. Dolgushin, Yu. S. Shishkova, A. Yu. Savochkina // Allergology and Immunology. – 2009. – V. 10, № 3, 458–462].

## PARTICIPATION OF PLASMA OF PREGNANT WOMEN DURING FORMATION OF EXTRACELLULAR TRAPS NEUTROPHIL

© 2019 A. Yu. Savochkina\*, O. S. Abramovskikh, E. N. Myakisheva, K. A. Abramovskikh

\*E-mail: [alina7423@mail.ru](mailto:alina7423@mail.ru)

South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation.  
Research Institute of Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Received: 26.05.2019. Accepted: 29.06.2019

Pregnancy is a unique phenomenon of the “peaceful coexistence” of the maternal organism and the semi-allogenic fetus. For maintenance of ability to live, growth, progress of an embryo and a fruit in an organism of future mother there are essential variations which concern practically all systems of an organism, including immune system and system of a hemostasis. In work results of an assessment of capacity neutrophils to formation NETs in I a trimester of pregnancy are presented.

*Key words:* Neutrophils, pregnancy, hemostasis, Neutrophil extracellular traps

### Authors:

**Savochkina A. Yu.**, ✉ MD, Associate Professor, Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics of the South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia.

Chelyabinsk, South Ural State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation. Phone: +79127725806,  
E-mail: [alina7423@mail.ru](mailto:alina7423@mail.ru)

**Abramovskikh O. S.**, MD, Associate Professor, Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics of the South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

**Myakisheva E. N.**, post-graduate student Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, South Ural State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

**Abramovskikh K. A.**, 5<sup>th</sup> year student of the medical faculty of the South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА С АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЕМ АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

© 2019 г. К. С. Савчук<sup>1\*</sup>, Л. В. Рябова<sup>2</sup>, К. В. Никушкина<sup>2</sup>,  
И. Л. Батурина<sup>2</sup>

\*E-mail: ksenyasavchuk@gmail.com

<sup>1</sup>Муниципальное автономное учреждение здравоохранения ордена трудового Красного Знамени  
Городская клиническая больница № 1, Челябинск, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия

Поступила: 21.05.2019. Принята: 27.06.2019

В настоящей статье представлены результаты исследования иммунного статуса у 43 пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2), страдающих атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей. Из них были сформированы две группы в зависимости от наличия ишемической болезни сердца (ИБС). С целью оценки характера иммунологических изменений определяли уровни иммуноглобулинов класса IgA, IgG, IgM, циркулирующих иммунных комплексов, цитокинов в сыворотке крови. Установлено, что пациенты с СД2 без ИБС в сравнении с пациентами с ИБС статистически значимо отличались большими уровнями интерлейкина-8. Не показано высокого содержания маркеров хронического воспаления – иммуноглобулинов классов IgA, IgG, циркулирующих иммунных комплексов, провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 в исследуемых группах

**Ключевые слова:** сахарный диабет 2 типа, ишемическая болезнь сердца, атеросклероз артерий нижних конечностей, иммунный статус, цитокины

DOI: 10.31857/S102872210007264-5

**Адрес:** 454048, Челябинск, улица Воровского, 16, Муниципальное автономное учреждение здравоохранения ордена трудового Красного Знамени Городская клиническая больница № 1. Савчук Ксения Сергеевна.  
Тел./факс: +7(351) 7284926, 89514521969 (моб.).

**E-mail:** ksenyasavchuk@gmail.com

### Авторы:

**Савчук К. С.**, заведующая отделением эндокринологии, врач-эндокринолог МАУЗ ОТКЗ ГКБ№ 1, Челябинск, Россия;

**Рябова Л. В.**, д.м.н., профессор кафедры пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

**Никушкина К. В.**, в.н.с. НИИ Иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

**Батурина И. Л.**, ст.н.с. НИИ Иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Атеросклероз и сахарный диабет (СД) – медико-социальные проблемы, существенно со-

крашающие продолжительность жизни и значительно ухудшающие её качество. Более раннее начало и агрессивное течение атеросклероза у больных сахарным диабетом 2 типа (СД2) часто связано с сопутствующей ишемической болезнью сердца (ИБС) [1]. В настоящее время атерогенез рассматривается и как хроническая воспалительная реакция [2]. Отмечено участие цитокинов в регуляции клеточного цикла, дифференцировке и апоптозе, ангиогенезе, в реализации процессов регуляции сосудистого тонуса, дисфункции эндотелия [3]. Установлено, что СД2 ассоциируется с провоспалительным иммунным статусом и увеличением уровня циркулирующих маркеров воспаления. В многочисленных работах показано, что такие цитокины как ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8 рассматриваются в качестве маркеров хронического воспаления сосудистой стенки, являясь предикторами сосудистых катастроф, их оценка позволяет выявить

индивидуумов с высоким риском сердечно-сосудистых осложнений [4].

**Цель работы.** Изучить состояние иммунной системы у пациентов с сахарным диабетом 2 типа и атеросклеротическим процессом в артериях нижних конечностей в зависимости от наличия ИБС.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 43 пациента с СД 2 типа, страдающих атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей. Средний возраст больных составил  $62,1 \pm 5,76$  лет.

В зависимости от наличия ИБС пациенты распределены на две группы: 22 пациента имели ИБС в сочетании с СД 2 типа (группа 1), у 21 пациента сопутствующая ИБС не была верифицирована (группа 2). Число мужчин и женщин оказалось примерно равным в сравниваемых группах и статистически не различалось: 8 мужчин и 14 женщин в группе 1, 7 мужчин и 14 женщин в группе 2. Средний возраст пациентов в группе 1 составил  $64,6 \pm 1,11$  и значимо не отличался в группе 2— $59,6 \pm 1,16$  ( $p < 0,05$ ).

Все пациенты давали информированное согласие на участие в исследовании.

Из исследования исключались пациенты, которые в анамнезе имели острый инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения, нарушение ритма сердца по типу фибрилляции предсердий, реконструктивные операции на сосудах, а также пациенты с установленным диагнозом синдрома диабетической стопы.

Иммунологическое обследование включало определение уровней иммуноглобулинов класса IgA, IgG, IgM, циркулирующих иммунных комплексов, цитокинов в сыворотке крови.

Количественное содержание иммуноглобулинов классов IgA, IgM, IgG в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем фирмы «Seramun Diagnostica» (Германия). Определение интерлейкинов-1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ), интерлейкинов-6 (ИЛ-6), интерлейкинов-8 (ИЛ-8), интерлейкинов-10 (ИЛ-10) и фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) выполнено с помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа согласно инструкции фирм-производителей («Цитокин», Россия) на ИФА-анализаторе «Personal Lab» (Италия). Количественное исследование циркулирующих иммунных комплексов проводили с использованием набора «IBL-INTERNATIONAL» (Германия).

При статистической обработке данных использовали ПО IBM SPSS Statistics, Version 19. Различия распределения величин между группами определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия между группами считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Пациенты обеих групп были сопоставимы по полу и возрасту, а также по стажу сахарного диабета 2 типа. Длительность СД в группе сочетанной патологии составила  $11,6 \pm 0,97$  лет, в группе изолированного СД— $10,6 \pm 1,28$  лет ( $p < 0,05$ ).

Из осложнений СД у всех пациентов были выявлены диабетическая макроангиопатия нижних конечностей и диабетическая нейропатия. На втором месте находились цереброваскулярные заболевания, на третьем — диабетическая нефропатия. Ишемическая болезнь сердца была представлена стенокардией напряжения II—III ФК. Достоверных различий по сопутствующим заболеваниям в исследуемых группах получено не было.

Частота назначения сахароснижающей терапии, в том числе инсулина, была сопоставимой в обеих группах. Анализ сопутствующей терапии также не выявил статистических различий в частоте назначения бета-адреноблокаторов, ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (иАПФ), блокаторов рецепторов ангиотензина II (БРА), антагонистов кальция, статинов, антиагрегантов.

В результате анализа полученных нами данных установлено, что у пациентов с атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей не выявлено выраженной дисиммуноглобулинемии. И достоверных различий между группами не получено (**Таблица 1**).

Также, у пациентов с сахарным диабетом 2 типа в обеих группах выявлено нормальное содержание циркулирующих иммунных комплексов (**Таблица 2**). Однако это не исключает участие последних в повреждении сосудистой стенки и возникновении пролиферативно-стенозирующих процессов. Сходные данные получены и Кузнецовым М. Р. и соавт. [5], показавших ведущую роль циркулирующих иммунных комплексов в определении вероятности развития стеноза артерий нижних конечностей.

Из медиаторов межлейкоцитарного взаимодействия наибольшее значение при атеросклерозе придается ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6, которые рас-

**Таблица 1.** Показатели концентрации иммуноглобулинов в исследуемых группах

Показатель	Группа 1 n = 22	Группа 2 n = 21	P
Общий иммуноглобулин А, г/л (норма 1,00–6,50 г/л)	3,33±0,27	3,24±0,29	0,989
Общий иммуноглобулин М, г/л (норма 0,70–3,70 г/л)	2,62±0,50	2,44±0,59	0,633
Общий иммуноглобулин G, г/л (норма 9,00–20,0 г/л)	13,6±1,37	13,7±1,40	0,888

**Таблица 2.** Показатели концентрации циркулирующих иммунных комплексов в исследуемых группах

Показатель	Группа 1 n = 22	Группа 2 n = 21	P
Циркулирующие иммунные комплексы (норма 28,0–86,0 у.е.)	44,7±13,7	40,1±4,55	0,471

**Таблица 3.** Показатели концентрации цитокинов в исследуемых группах

Показатель	Группа 1 n = 22	Группа 2 n = 21	P
ИЛ-1β, пг/мл	1,52±0,13	1,16±0,09	0,079
ИЛ-6, пг/мл	2,64±0,19	3,01±0,26	0,456
ИЛ-8, пг/мл	10,4±1,69	48,5±12,1	0,002
ИЛ-10, пг/мл	1,84±1,16	2,43±0,28	0,217
ФНО-α, пг/мл	0,46±0,04	0,58±0,07	0,318

смачивается многими авторами как фактор повреждения эндотелия сосудов [6, 7]. При анализе данных не выявлено статистически значимых различий по данным параметрам в исследуемых группах (**Таблица 3**). Но, обращает на себя внимание достоверно большие значения интерлейкина-8 (ИЛ-8) в группе изолированного СД2. По данным современной литературы, ИЛ-8 способен непосредственно стимулировать провоспалительную активность макрофагальных клеток и отражать воспалительный процесс, происходящий в артериальной стенке у больных СД2.

### ВЫВОДЫ:

1. Наиболее выраженные изменения регистрировались у пациентов с изолированным сахарным диабетом 2 типа и характеризовались достоверно большими значениями интерлейкина-8.

2. Результаты исследования показали отсутствие выраженных различий в иммунном статусе у больных СД 2 типа с атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей в зависимости от наличия ИБС.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Богданова Е. А., Шустов С. Б., Свистов А. С., Кицышин В. П. Особенности ишемии миокарда у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с ишемической болезнью сердца по данным суточного мониторирования электрокардиограммы. Вестник Российской Военно-Медицинской Академии 2012, 1(37), 44–48. [Bogdanova E. A., Shustov S. B., Svistov A. S., Kitsyshin V. P. Characteristics of myocardial ischemia in patients with diabetes mellitus type 2 and coronary artery disease based on the data of 24-hour ambulatory electrocardiographic monitoring. Herald of the Russian Military Medical Academy 2012, 1(37), 44–48.]
2. Аймагамбетова А. О. Атерогенез и воспаление. Наука и здравоохранение 2016,1, 24–39. [Aimagambetova A. O. Atherogenesis and inflammation. Science and Health 2016,1, 24–39.]

- mbetova A. O.* Atherogenesis and inflammation/ Science and Healthcare 2016,1, 24–39.]
3. *Фрейдлин И. С., Шейкин Ю. А.* Эндотелиальные клетки в качестве мишеней и продуцентов цитокинов. Медицинская иммунология, 2001, Т. 3, № 4, 499–514. [*Freidlin I. S., Sheikine Y. A.* Endothelial cells as targets and producers of cytokines. Med. Immunol., 2001, vol.3, № 4, 499–514.]
  4. *Насонов Е. Л.* Иммунологические маркеры атеросклероза. Антифосфолипидный синдром, 2004, 298. [*Nasonov E. L.* Immunologic markers of atherosclerosis. Antiphospholipid sindrom, 2004, 298.]
  5. *Кузнецов М. Р., Болдин Б. В., Кошкин В. М.* Прогнозирование отдаленных результатов оперативного лечения больных с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей. Ангиология и сосудистая хирургия, 2008, Т. 14, № 1, 106–112. [*Kuznetsov M. R., Boldin B. V., Koshkin V. M.* Prognostirovanie otdalennykh rezul'tatov operativnogo
  6. *Кремнева Л. В., Шалаев С. В.* Интерлейкин-6 и молекулы межклеточной адгезии: связь с факторами риска и прогнозом ишемической болезни сердца. Клинич. Фармакология и терапия, 2002, № 5, 78–81. [*Kremneva L. V., Shalaev S. V.* Interleykin-6 i molekuly mezhklyetchnoy adgezii: svyaz' s faktorami riska i prognozom ishemicheskoy bolezni serdtsa. Klinich. Farmakologiya i terapiya. 2002,5,78–81. Russian.]
  7. *Мазуров В. И., Столов С. В., Линецкая Н. Э.* Динамика уровней провоспалительных цитокинов у больных в зависимости от различных форм ИБС. Клинич. Медицина, 2001, № 2, 23–27. [*Mazurov V. I., Stolonov S. V., Linetskaya N. E.* Dinamika urovney provospalitel'nykh tsitokinov u bol'nykh v zavisimosti ot razlichnykh form IBS. Klinich. Meditsina, 2001,2,23–7. Russian.]

## CHARACTERISTIC OF IMMUNOLOGICAL STATUS AT PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 2 COMBINED WITH ATHEROSCLEROTIC ARTERIAL DISEASE OF LOWER LIMBS

© 2019 K. S. Savchuk<sup>1\*</sup>, L. V. Ryabova<sup>2</sup>, K. V. Nikushkina<sup>2</sup>, I. L. Baturina<sup>2</sup>

\* E-mail: ksenyasavchuk@gmail.com

<sup>1</sup> Municipal autonomous institution of healthcare order of the Red Banner of Labour city clinic hospital No 1, Chelyabinsk, Russia;

<sup>2</sup> Federal state budgetary educational institution of higher education "South Ural State Medical University", Chelyabinsk, Russia

**Received:** 21.05.2019. **Accepted:** 27.06.2019

This article shows results of immunological status' research at patients with diabetes mellitus type 2 (DM2) combined with atherosclerotic artery disease of lower limbs. Depending on presence of coronary artery disease (CAD) two groups of patients were formed up. With the view to validation of immunological changes' qualities, we detected levels of IgA, IgG and IgM, circulating immune complex and blood serum cytokine's levels. It's elucidated, that patients with DM2 without CAD, compared with patients with CAD, have significant high levels of Interleukin 8. There were no high level markers of chronic inflammation (IgA, IgG, circulating immune complex and pro-inflammatory cytokines Il-1 $\beta$  and Il-6) detected in groups of interest.

*Key words:* diabetes mellitus 2 type, coronary artery disease, atherosclerotic artery disease of lower limbs, immunological status, cytokines

### Authors:

**Savchuk K. S.**, ✉ endocrinologist, Municipal autonomous institution of healthcare order of the Red Banner of Labour city clinic hospital № 1, Chelyabinsk, Russia;

Chelyabinsk, Municipal autonomous institution of healthcare order of the Red Banner of Labour city clinic hospital № 1.

Phone: +7(351) 7284926, 89514521969; **E-mail:** ksenyasavchuk@gmail.com

**Ryabova L. V.**, holder of Habilitation degree in medicine, professor of Propaedeutics of Internal Diseases in Federal state budgetary educational institution of higher education "South Ural State Medical University", Chelyabinsk, Russia;

**Nikushkina K. V.**, senior researcher of Research institute of immunology at Federal state budgetary educational institution of higher education "South Ural State Medical University", Chelyabinsk, Russia;

**Baturina I. L.** senior researcher of Research institute of immunology Federal state budgetary educational institution of higher education "South Ural State Medical University", Chelyabinsk, Russia.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЕПТИДСОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПАРОДОНТИТА

© 2019 г. Н. Г. Саркисян\*, Н. С. Чумаков, М. А. Гренадерова

\*E-mail: [narine\\_25@mail.ru](mailto:narine_25@mail.ru)

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства  
Здравоохранения Российской Федерации, Екатеринбург, Россия

Поступила: 25.05.2019. Принята: 25.06.2019

В данной статье рассматривается проблема лечения хронического пародонтита. На созданной модели хронического воспаления десны в экспериментальном исследовании на крысах линии Вистар, был предложен и оценен метод топической терапии, с применением новой композиции пептидсодержащего глицерогидрогеля кремния, а также проведено сравнение активности композиции с глицерогидрогелем кремния. Установлено, что по основным клиническим признакам, композиция оказывает хорошее репаративное и антимикробное действие, что позволяет подойти к терапии хронического пародонтита как в патогенетическом, так и в этиологическом аспекте. Сроки клинического улучшения увеличились в группе с применением композиции с антимикробным пептидом и глицерогидрогелем кремния на 57%, по сравнению с группой в которой применялся только глицерогидрогель кремния.

**Ключевые слова:** глицерогидрогель кремния, антимикробные пептиды, хронический пародонтит

DOI: 10.31857/S102872210007265-6

**Адрес:** Екатеринбург, ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Саркисян Нарине Гришаевна. Тел.: +7 (902) 875-53-99. E-mail: [narine\\_25@mail.ru](mailto:narine_25@mail.ru)

**Авторы:**

**Саркисян Н. Г.**, д.м.н., ассистент кафедры терапевтической стоматологии и пропедевтики стоматологических заболеваний ФГБОУ ВО «УГМУ», Екатеринбург, Россия;

**Чумаков Н. С.**, студент стоматологического факультета ФГБОУ ВО «УГМУ», Екатеринбург, Россия;

**Гренадерова М. А.**, студент лечебно-профилактического факультета ФГБОУ ВО «УГМУ», Екатеринбург, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Воспаление пародонта представляет собой распространенную, а также сложную для решения задачу в стоматологии. Пародонтит — это воспалительное заболевание пародонта (комплекс тканей, включающих в себя периодонт, костную ткань и десну зубочелюстного сегмента), протекающее с потерей зубов [1]. Научная концепция, определяющая развитие локального воспаления, как результат реализации иммунного ответа непосредственно в клетках тканей

слизистой оболочки полости рта приобретает все большую актуальность [2].

Клиника хронического пародонтита развивается постепенно. В начальную стадию заболевания больные предъявляют жалобы на кровоточивость десен во время чистки зубов. В последующем, при увеличении тяжести заболевания, определяется патологическая подвижность зубов, неприятный запах изо рта, покраснение десны и выделение гноя из зубодесневого пространства, что связано с прогрессирующей деструкцией костной ткани альвеолы, а также активизацией патогенной микрофлоры [3]. Заболевание склонно к хронизации и невосприимчивости к лечению [4], а отсутствие эффективного комплексного подхода обуславливает необходимость поиска новых принципов терапии пародонтита, обоснованных на патогенетических особенностях развития болезни.

Одна из главных проблем заключается в том, что в связи с активным применением антибактериальных препаратов многие микроорганизмы

приобрели лекарственную устойчивость. Этот факт диктует необходимость поиска новых способов терапии инфекционных заболеваний полости рта. Локальное воздействие иммуностропных препаратов, включающих регуляторные молекулы и активацию параметров врожденного иммунитета, путем применения топических иммуностропных композиций, является необходимым.

На сегодняшний день антимикробные пептиды (АМП) представляются наиболее перспективными средствами [5]. Сочетание в себе антимикробного, противовоспалительного, васкулогенного и иммуномодулирующего свойств дают возможность комплексно подходить, воздействуя на различные звенья патогенеза заболевания. Антимикробные пептиды способны оказывать действие не только на этиологический фактор заболевания, но и положительно влиять на восстановление структуры тканей.

Механизм действия АМП до сих пор не до конца изучен, однако имеется представление первичной модели действия, которая заключается в следующем. Под действием электростатических сил происходит первичный контакт пептида и целевого организма. Положительно-заряженная молекула пептида осаждается на отрицательно-заряженной мембране клетки и чем больше разница зарядов, тем быстрее протекает процесс. После, пептиды встраиваются в мембрану, образуя пору. В зависимости от модели встройки пептидов в липидный слой, образуются цилиндрическая или тороидальная (когда между молекулами имеются прослойки липидного слоя) структура. За счет формы образующихся пор, предопределяется антимикробная активность и эффективность препарата [6].

Для достижения максимальной эффективности антимикробных пептидов нами было предложено использование кремнийорганического глицерогидрогеля (Силативит) [7], обладающего кроме противовоспалительного и ранозаживляющего действия транскутанной активностью,

вследствие чего, глицерогидрогель кремния рассматривается, в композиции с АМП, в качестве проводника.

Таким образом, целью исследования стала разработка нового метода лечения хронического пародонтита, а также оценка его эффективности.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На базе ФГБУН ИИФ УрО РАН г. Екатеринбург было проведено исследование на 2 группах лабораторных крыс линии Вистар. Исследование включало в себя создание модели хронического воспаления десны, нанесение композиций в зону воспалительного очага, а также последующую клиническую оценку эффективности лечения.

В каждую группу были включены по 10 самок в возрасте 3 месяцев, средний вес 470–480 г. (Таблица 1).

Модель хронического пародонтита воссоздавалась путем введения в периодонтальное пространство нижнего резца иглы длиной 12 мм, после чего инородное тело извлекалось на 26 день эксперимента (патент РФ № 2545923) [8]. Все болезненные процедуры выполнялись согласно Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным. Во время нахождения иглы в периодонтальном пространстве наблюдались явные патоморфологические изменения в области введения иглы (гиперемия десны, ее отечность, изменение цвета зуба, подвижность зуба). Далее в течение 10 дней проводилось лечение пародонтита с помощью нанесения препаратов: глицерогидрогеля кремния в первой группе и композиции глицерогидрогель-пептид во второй группе. В последующем были получены образцы зубо-альвеолярных сегментов, для последующего гистологического исследования. Данные по контрольной группе, где лечение не проводилось, ранее описаны в предшествующих исследованиях, и были использованы для сравнения [9,10].

Таблица 1. Вес исследуемых животных (в граммах)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Средний вес (гр)
Группа «Силативит»	457	438	485	461	455	447	463	482	451	461	460
Группа «Силативит-пептид»	472	497	477	485	473	477	489	475	469	487	480

Примечание: \*Статистически значимые различия между показателями ( $p < 0,5$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В процессе лечения гиперемия и отечность спадали в обеих группах. В группе, лечение которой проводилось глицерогидрогелем кремния гиперемия и отечность десны полностью пропали на 7 сутки, а в группе, лечение которой проводилось композицией глицерогидрогель-пептид, отечность и гиперемия полностью спадали на 4 сутки, (в 1,75 раза показатели улучшились) (Таблица 2).

Кроме того, у 75% испытуемых отмечалось снижение веса в среднем на 23% (Диаграмма 1). Возможно, это связано с тем, что крысы питались, в основном, гранулированным комбикормом. И к моменту начала лечения питание их нарушалось, вследствие развития патоморфологических изменений в пародонте.

Интересной особенностью явился тот факт, что у всех крыс, лечение которых проводилось глицерогидрогелем кремния, образовались кисты, полость которых была заполнена гнойным экссудатом. У крыс, лечение которых проводилось композицией глицерогидрогель-пептид,

подобных изменений не наблюдалось. Это позволяет предположить, что композиция глицерогидрогель-пептид обладает большей антимикробной активностью.

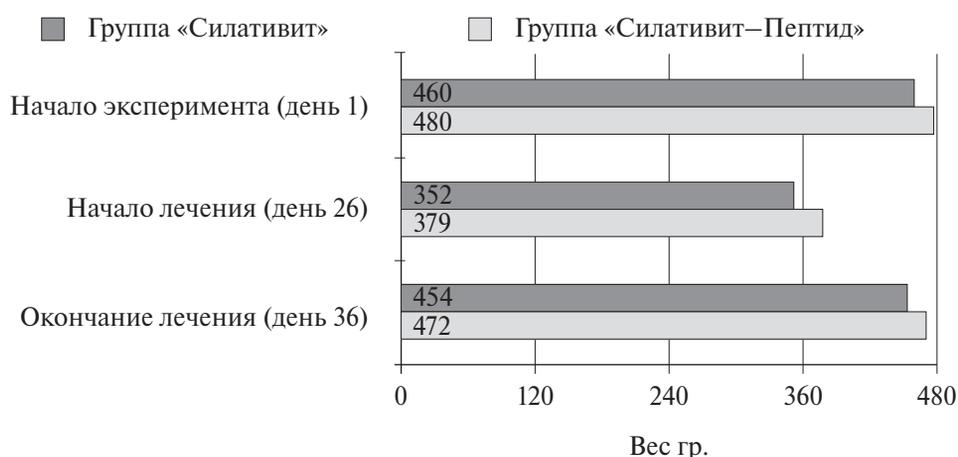
## ОБСУЖДЕНИЕ

Композиция глицерогидрогель-пептид показала более хороший терапевтический эффект, чем глицерогидрогель кремния, так как клинические проявления воспаления пропадали по временным срокам раньше. Кроме того, при лечении экспериментальной группы с применением пептида не происходило образование кист и их нагноение. Для более конкретной патоморфологической оценки эффективности лечения планируется проведение гистологического исследования.

Результаты клинической картины после лечения глицерогидрогелем кремния с пептидом позволили предположить, что клиническое улучшение является показателем противомикробной активности композиции и необходимости дальнейшего изучения свойств препарата. Уско-

**Таблица 2.** Табличное отображение изменения выраженности основных клинических симптомов у исследуемых животных

Группа «Силативит»	1 день	3 день	5 день	7 день	10 день	Группа «Силативит-пептид»	1 день	3 день	5 день	7 день	10 день
Гиперемия	+	+	+	-	-	Гиперемия	+	+	-	-	-
Отек	+	+	+	-	-	Отек	+	+	-	-	-
Кровоточивость	+	+	+	-	-	Кровоточивость	+	+	-	-	-



**Диаграмма 1.** Графическое отображение изменения веса исследуемых животных

рение сроков заживления и иное клиническое течение воспалительного процесса при применение пептида с глицерогидрогелем кремния в сравнении с группой, где применялся только глицерогидрогель (образование кист) показало эффективность топической терапии хронического воспаления десны у исследуемых животных с использованием АМП.

## ВЫВОДЫ

1. За счёт наличия в составе композиции глицерогидрогель-пептид антимикробного компонента, оказывается влияние не только на патогенетическое звено заболевания, но и на этиологическое.

2. Планируемое гистологическое исследование поможет детально определить морфологические изменения от воздействия композиции.

## БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают глубокую признательность директору ФГБУН ИИФ УрО РАН г. Екатеринбург д.ф.-м.н., Соловьевой О.Э. за предоставление возможности проведения исследования на базе учреждения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Т. П. Скрипникова, Л. М. Хавалкина, А. А. Хавалкина. Рефрактерное течение пародонтита. Особенности его клиники // Украинський стоматологічний альманах. 2012, № 2. [Т. П. Skripnikova, L. M. Khavalkina, A. A. Khavalkina. Refractory periodontitis. Features of his clinic // Ukrainian Dental Almanac. 2012. № 2]
2. Саркисян Н. Г. Молекулярно-генетический анализ факторов врожденного иммунитета как обоснование локальной иммунотерапии пародонтита: автореф. дис. ... докт.мед.наук /Н.Г.Саркисян. Екатеринбург, 2018. 40 с. [Sarkisyan N. G. Molecular genetic analysis of factors of innate immunity as a rationale for local immunotherapy of periodontitis: author. dis. ... Doctor of Medicine / N. G. Sargsyan. Ekaterinburg, 2018. 40c]
3. Levine M., LaPolla S., Owen W. L., & Socransky S. S. (2002). Antibody-based diagnostic for 'refractory' periodontitis. Journal of clinical periodontology, 29(10), 935–43;
4. Нацвлишвили Т. Т., Цимбалитов А. В., Шторина Г. Б., Кадурин Т. И. Клинико-рентгенологические параллели генерализованных форм агрессивного и хронического пародонтита // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. 2011. № 4. [Natsvlishvili T. T., Tsimbalistov A. V., Shtorina G. B., Kadurina T. I. Clinical and radiological parallels of generalized forms of aggressive and chronic periodontitis // Herald of the North-West State Medical University. I. I. Mechnikov. 2011. № 4.]
5. Carmona-Ribeiro, Ana Maria and Letícia Dias de Melo Carrasco. "Novel formulations for antimicrobial peptides" International journal of molecular sciences vol. 15,10 18040–83. 9 Oct. 2014, doi:10.3390/ijms151018040.
6. Мусин Х. Г. Антимикробные пептиды – потенциальная альтернатива традиционным антибиотикам. Инфекция и иммунитет. 2018; 8(3): 295–308. [Musin H. G. Antimicrobial peptides are potentially noticeable to traditional antibiotics. Infection and immunity. 2018; 8 (3): 295–308.]
7. Патент на изобретение № 2470640 РФ. Средство для лечения воспалительных заболеваний полости рта и способ лечения воспалительных заболеваний полости рта / О. Н. Чупахин, А. С. Симбирцев, Т. Г. Хонина, Н. Г. Саркисян и др.; опубл. 27.12.2012. // Бюл. 2012. № 36. 16 с. [The patent for the invention № 2470640 of the Russian Federation. Means for treating inflammatory diseases of the oral cavity and a method of treating inflammatory diseases of the oral cavity / O. N. Chupakhin, A. S. Simbirtsev, T. G. Honina, N. G. Sarkisyan et al. ; publ. 12/27/2012. // Bull. 2012. № 36. 16 p.]
8. Способ получения модели хронического пародонтита у крыс / Н. Г. Саркисян, А. С. Тимченко, Л. П. Ларионов, И. А. Тузанкина // Уральский медицинский журнал. 2014. № 3. С. 54–56. [A method of obtaining a model of chronic periodontitis in rats / N. G. Sarkisyan, A. S. Timchenko, L. P. Larionov, I. A. Tuzankin // Ural Medical Journal. 2014. № 3. p. 54–56.]
9. Морфологическая оценка эффективности использования фармакологических композиций на основе кремнийорганического глицерогидрогеля / Н. Г. Саркисян, Г. И. Ронь, И. А. Тузанкина, Т. Г. Хонина, Л. П. Ларионов, А. С. Симбирцев, Л. И. Дроздова, А. С. Тимченко // Иммунология. 2017. Т. 38, № 2. С. 91–96. [Morphological assessment of the effectiveness of the use of pharmacological compositions based on organosilicon glycerohydrogel / N. G. Sargsyan, G. I. Ron, I. A. Tuzankina, T. G. Honina, L. P. Larionov, A. S. Simbirtsev, L. I. Drozdova, A. S. Timchenko // Immunology. 2017. Vol. 38, No. 2. P. 91–96.]
10. Применение терапевтической композиции топического применения, содержащей препараты Ацеграм и силативит гель, на модели хронического пародонтита у крыс. / Н. А. Овсян, И. А. Тузанкина, Н. Г. Саркисян, М. А. Долгих, Соколова К. В., 2017, Российский иммунологический журнал, 11(3) стр.448–450. [Use of the topical therapeutic composition, containing drug Acegram and silatitvit gel, on the model of chronic parodontitis in rats. / N. A. Ovsyepyan, I. A. Tuzankina, N. G. Sarkisyan, M. A. Dolgih, K. V. Sokolova, 2017, Russian immunological Journal, 11(3), p. 448–450.]

## EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF THE PEPTIDE-CONTAINING DRUG IN THE TREATMENT OF CHRONIC PERIODONTITIS

© 2019 N. G. Sarkisyan\*, N. S. Chumakov, M. A. Grenaderova

\*E-mail: [narine\\_25@mail.ru](mailto:narine_25@mail.ru)

*Federal State Budgetary Institution of Higher Education "Ural State Medical University"  
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Yekaterinburg, Russia*

**Received:** 25.05.2019. **Accepted:** 25.06.2019

This article addresses the problem of treating chronic periodontitis. On the model of chronic inflammation of the gums created in an experimental study on Wistar rats, a method of topical therapy was proposed and evaluated using a peptide containing silicon glycerogel composition, and the composition was also compared with silicon glycerogel. It has been established that, according to the main clinical features, the composition has a good reparative and antimicrobial effect, which makes it possible to approach the therapy of chronic periodontitis both in the pathogenetic and etiological aspects. The timing of clinical improvement increased in the group using the composition with an antimicrobial peptide and silicon glycerogel by 57%, compared with the group in which only glycerohydrogel silicon was used.

*Key words:* chronic parodontitis, glycerohydrogel, antimicrobial peptides

### Authors:

**Sarkisyan N. G.**, ✉ MD, Assistant Professor, Department of Therapeutic Dentistry and Propedeutics of Dental Diseases, FSBEI HE "UGMU", Yekaterinburg, Russia.

Ekaterinburg, Ural State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation. Tel.: +7 (902) 875-53-99,

**E-mail:** [narine\\_25@mail.ru](mailto:narine_25@mail.ru);

**Chumakov N. S.**, student of the Faculty of Dentistry FSBEI HE "UGMU", Yekaterinburg, Russia;

**Grenaderova M. A.**, student of the treatment-and-prophylactic faculty of FSBEI HE "UGMU", Yekaterinburg, Russia.

## ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У МЫШЕЙ-РЕЦИПИЕНТОВ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МОДУЛИРОВАННЫХ ИММУННЫХ КЛЕТОК

© 2019 г. Е. В. Серенко\*, М. А. Княжева

\*E-mail: serenko.evgeniy@mail.ru

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,  
Новосибирск, Россия

Поступила: 18.05.2019. Принята: 24.06.2019

В данной статье рассматривается проблема регуляторных взаимоотношений основных адаптационных систем организма – иммунной и нервной. Все больше данных свидетельствуют о том, что иммунная система способна оказывать координирующее влияние на поведение и эмоциональные реакции животных и человека. Ориентировочно-исследовательское поведение представляет собой один из важнейших типов поведения, который обеспечивает индивидуума знанием об окружающей среде и является существенным психологическим механизмом адаптации высших позвоночных. Целью статьи является анализ психофизиологических показателей у экспериментальных животных после трансплантации иммунных клеток, функциональная активность которых была экстракорпорально изменена психоактивным веществом. Продемонстрировано, что после трансплантации иммунных клеток с модулированной *in vitro* аминазином функциональной активностью у мышей-реципиентов регистрируются редактирование указанного поведения на фоне повышения в головном мозге цитокинов ИЛ-1β, ФНОα, ИЛ-6; а также снижение интенсивности гуморального и клеточного иммунного ответа. Представленные результаты показывают возможность использования иммунных клеток в качестве модельных объектов для воздействия на нейроиммунную функциональную взаимосвязь; равно как и перспективность применения клеточных технологий для редактирования поведенческих паттернов.

**Ключевые слова:** иммунные клетки, аминазин, иммунный ответ, мозг, цитокины, поведение

DOI: 10.31857/S102872210007267-8

Адрес: 630099, Новосибирск, Ядринцевская ул., 14, ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», лаборатория нейроиммунологии, Серенко Евгений Владимирович. Тел./ факс: +7(383) 222-06-72, +79039346786 (моб.).

E-mail: serenko.evgeniy@mail.ru

**Авторы:**

**Серенко Е. В.**, аспирант лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

**Княжева М. А.**, аспирант лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире в последние десятилетия проявляют себя последствия стресса, вызванного стихийными бедствиями, военными конфликтами, техногенными катастрофами, которые могут приводить к нарушению механизмов адаптации и, как следствие, формированию нарушений

в психоэмоциональной сфере, существенным звеном патогенеза которых является нарушение нейроиммунных взаимодействий [1, 2, 3, 4, 5]. Психоактивные препараты, применяемые для коррекции поведенческих расстройств достаточно эффективны, однако, обладают рядом негативных побочных эффектов, что в ряде случаев ограничивает возможности их длительного использования. Кроме того растет количество пациентов, резистентных к данной терапии [6]. Одним из способов решения этой проблемы является разработка новых методов терапии поведенческих расстройств на основе иммунологических подходов.

Ориентировочно-исследовательское поведение (ОИП) представляет собой один из важнейших типов поведения, который обеспечивает индивидуума знанием об окружающей среде и является существенным психологическим ме-

ханизмом адаптации высших позвоночных. Активное поведение в условиях неопределенности – значимый фактор соматического здоровья, предотвращающий возникновение психосоматических заболеваний и повышающий устойчивость организма к стрессу [7]. Установлено, что функциональная активность иммунной системы и, в частности, ее клеточных элементов, связана с уровнем ОИП, параметры которого могут быть направленно изменены трансплантацией иммунных клеток с определенными функциональными характеристиками [3, 8, 9, 10, 11].

**Цель исследования:** оценить психофизиологические показатели у экспериментальных животных после трансплантации иммунных клеток, функциональная активность которых была экстракорпорально изменена обработкой аминазином.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании в качестве доноров и реципиентов использовались мыши-самцы (СВАхС57В1/6) F1 в возрасте трех месяцев; средний вес животных составлял 20–25 граммов. Животных содержали в условиях лабораторного вивария по 10 особей в клетке, не менее 2-х недель до начала экспериментов на стандартной диете, при свободном доступе к воде и нормальном световом режиме. Эксперимент проводился соответственно правилам, принятым на Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986 г.), правилам лабораторной практики (приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003, № 267).

ОИП животных (интактных и после клеточной трансплантации) оценивали в тесте “открытое поле” [12]. По характеру поведения в «открытом поле» мыши (СВАхС57В1/6) F1 делятся на три группы: с высоким, средним и низким уровнями указанного поведения [3, 13]. Учитывая фармакологический эффект аминазина, в экспериментах в качестве доноров и реципиентов использовались животные характеризующиеся высоким уровнем ОИП, т.е. активным типом указанного поведения.

Спленциты мышей-доноров выделяли в стерильных условиях, обрабатывали *in vitro* аминазином, из расчета  $15 \times 10^6$  клеток / 150 мкг препарата в течение 25 минут, и трансплантировали реципиентам согласно описанной ранее методи-

ке [14]. Концентрация нейрореплика, применяемая для обработки клеток, определялась путем перерасчета терапевтической дозы, с учетом веса и особенностей метаболизма животных. Жизнеспособность клеток определяли окраской трипановым синим. Контрольным животным трансплантировали клетки в аналогических условиях эксперимента, за исключением того, что иммунциты прекультивировались без аминазина. У мышей-реципиентов определялись параметры ОИП, количественное содержание цитокинов в лизатах клеток головного мозга, гуморальный и клеточный иммунный ответ.

Лизаты головного мозга животных получали путем гомогенизирования тканей в среде RPMI-1640 с добавлением 0,1% Triton X–100 (GERBU Biotechnik GmbH), с центрифугированием 10000 об/мин в течение 3 минут. Надосадочную жидкость содержали при  $-80$  °С до момента исследования.

Исследование пролиферативной активности клеток после обработки *in vitro* аминазином оценивали стандартным методом по включению в нуклеопротеидные фракции клеток радиоактивной метки ( $^3\text{H}$ -тимидин). Результаты представляли в виде среднего счета в имп/мин.

Количественное содержание цитокинов оценивали методом ИФА (ELISA) с использованием компонентов к цитокинам мыши производства фирмы “R&D Systems” (Великобритания), согласно инструкции фирмы производителя. Чувствительность наборов для ИЛ-1 $\beta$  не превышает 5 пг/мл, для ИЛ-6 – 2 пг/мл, для ФНО $\alpha$  – 1 пг/мл.

Интенсивность гуморального иммунного ответа оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК) в селезенке на 5-е сутки после внутрибрюшинной иммунизации антигеном модифицированным методом А. J. Cunningham [15].

Интенсивность клеточного иммунного ответа оценивали по высоте реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Для этого мышей иммунизировали внутрибрюшинным введением эритроцитов барана (0,5% – 0,5 мл.). Разрешающую дозу указанного антигена (50% – 0,05 мл.) вводили под апоневроз задней стопы через 96 часов. Формирование реакции ГЗТ оценивали через 24 часа после разрешающей инъекции по степени опухания лапы (изменения её толщины по сравнению с позитивно-контрольной задней лапой того же животного, в которую была введена среда RPMI-1640). Индекс

реакции (ИР) определяли для каждой мыши по формуле  $ИР = (P_0 - P_k) / P_k$  и выражали в процентах [16].

Статистическая обработка результатов производилась с применением парного критерия Манна-Уитни, используя компьютерную программу "Statistica 10.0". Результаты представлены в виде  $M \pm SD$ . Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенного исследования показано, что культивирование с аминазином спленоцитов мышей модулирует функциональную активность иммунных клеток, проявляющуюся в снижении спонтанной пролиферативной активности (Рис. 1).

Трансплантация спленоцитов с модулированной *in vitro* аминазином функциональной активностью сингенным мышам с активным типом ОИП сопровождалась у реципиентов редактированием указанного поведения, что выражалось в снижении показателей горизонтальной двигательной активности, отражающей моторный компонент ОИП, равно как и показателей вертикальной двигательной активности, отражающей исследовательский компонент поведения (Табл. 1).



**Рис. 1.** Спонтанная пролиферативная активность спленоцитов (имп/ мин) мышей (CBAxС57Bl)F1, обработанных *in vitro* аминазином ( $M \pm SD$ )

**Примечание:** 1 – спленоциты культивированные без аминазина; 2 – спленоциты, культивированные с аминазином; \* –  $p < 0,01$  между контрольной и опытной группами животных.

Указанные изменения в поведении мышей-реципиентов после трансплантации модулированных аминазином иммунных клеток регистрировались на фоне достоверного повышения количественного содержания в головном мозге ряда провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО $\alpha$  (Табл. 2).

Известно, что указанные цитокины задействованы в реализации поведенческих реакций

**Таблица 1.** Параметры ориентировочно-исследовательского поведения мышей-реципиентов (CBAxС57Bl)F1 после трансплантации спленоцитов, обработанных *in vitro* аминазином ( $M \pm SD$ )

Группы животных-реципиентов	Горизонтальная двигательная активность			Вертикальная двигательная активность		
	периферическая	центральная	суммарная	свободные стойки	стойки с опорой на стенку	суммарная
контроль (n = 47)	144,0 $\pm$ 13,9	8,0 $\pm$ 4,0	152,0 $\pm$ 17,9	0,8 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 1,1	2,9 $\pm$ 1,3
опыт (n = 38)	70,7 $\pm$ 9,9*	0,4 $\pm$ 0,1*	71,1 $\pm$ 10,1*	0,2 $\pm$ 0,5*	0,7 $\pm$ 0,1*	1,0 $\pm$ 0,6*

**Примечание:** Опытная группа – мыши-реципиенты после трансплантации спленоцитов, экстракорпорально обработанных аминазином. Контрольная группа – мыши-реципиенты после трансплантации спленоцитов, прекультивированных без аминазина. \* –  $p < 0,01$  между контрольной и опытной группами животных

**Таблица 2.** Содержание цитокинов в лизатах головного мозга мышей-реципиентов (CBAxС57Bl)F1 после трансплантации спленоцитов, обработанных *in vitro* аминазином ( $M \pm SD$ )

Группы животных -реципиентов	Содержание цитокинов (пг/мл)		
	ИЛ-1 $\beta$	ИЛ-6	ФНО $\alpha$
Контрольная группа (n = 12)	82,7 $\pm$ 37,0	688,5 $\pm$ 101,8	152,5 $\pm$ 25,3
Опытная группа (n = 12)	135,4 $\pm$ 22,3*	976,7 $\pm$ 117,6*	202,9 $\pm$ 46,7*

**Примечание:** опытная группа – мыши-реципиенты после трансплантации спленоцитов экстракорпорально обработанных аминазином; контрольная группа – мыши-реципиенты после трансплантации спленоцитов прекультивированных без аминазина. \* –  $p < 0,01$  между контрольной и опытной группами животных.

**Таблица 3.** Гуморальный и клеточный иммунный ответ у мышей-реципиентов (СВАхС57Вl)F1 после трансплантации спленоцитов, обработанных *in vitro* аминазином (M ± SD)

Исследуемый параметр	Группы животных (n=10 в каждой группе)	
	Контроль	Опыт
Число АОК/10 <sup>6</sup> ядросодержащих клеток селезенки	463,6±190,6	188,2±111,5**
Число АОК на селезенку	112764,5±24138	58643,7±9275,5**
Реакция ГЗТ (ИР %)	51,9±23,4	28,8±12,6*

**Примечание:** опытная группа – мыши-реципиенты после трансплантации спленоцитов экстракорпорально обработанных аминазином; контрольная группа – мыши-реципиенты после трансплантации спленоцитов, прекультивированных без аминазина. \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$  между соответствующими показателями в контрольной и опытной группах животных.

высших позвоночных, равно как и играют существенную роль в патогенезе поведенческих расстройств [1, 2, 4, 6, 9]. Изменение содержания этих регуляторных цитокинов в центральной нервной системе реципиентов может быть одним из механизмов показанного выше редактирования их поведения модулированными психоактивным веществом иммунными клетками.

Показана также модуляция иммунного ответа у сингенных мышей-реципиентов после трансплантации спленоцитов, обработанных *in vitro* аминазином. Это выражается в снижении относительного и абсолютного количества АОК селезенки, что отражает интенсивность гуморального звена иммунного ответа, а также в снижении высоты реакции ГЗТ, отражающей интенсивность клеточного звена иммунного ответа (Табл. 3).

Таким образом, трансплантация иммунных клеток с модулированной экстракорпорально аминазином функциональной активностью сопровождается:

а) изменением функциональной активности нервной системы реципиентов, о чем свидетельствует снижение параметров ОИП на фоне повышения в головном мозге уровней цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ФНО $\alpha$ , ИЛ-6;

б) модуляцией функциональной активности иммунной системы реципиентов, о чем свидетельствует снижение интенсивности гуморального и клеточного иммунного ответа.

Представленные результаты показывают возможность использования иммунных клеток в качестве модельных объектов для воздействия на нейроиммунную функциональную взаимосвязь; равно как и перспективность применения клеточных технологий для редактирования поведенческих паттернов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Ader R. Psychoneuroimmunology. University of Chicago Press. 2007. V.1. 1269 p.
2. Straub R. H., Cutolo M. Psychoneuroimmunology-developments in stress research. //Wien Med. Wochenschr. 2018. – V. 168 (3–4). – P. 76–84.
3. Маркова Е. В. Иммунная система и высшая нервная деятельность. Механизмы нейроиммунных взаимодействий в реализации и регуляции поведенческих реакций / Saarbrücken, 2012. [Markova E. V. Immune system and higher nervous activity. Mechanisms of neuroimmune interactions in realization and regulation of behavioural reactions / Saarbrücken, 2012.]
4. Идова Г. В., Маркова Е. В., Геворгян М. М., Альперина Е. Л., Жукова Е. Н. Изменения продукции цитокинов клетками селезенки мышей линии C57BL/6J при агрессии, индуцированной социальным стрессом// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.–2015.– Т. 160.– № 11.– С. 631–634. [Idova G. V., Markova E. V., Gevorgyan M. M., Alperina E. L., Zhukova E. N. Changes of products of tsitokin cells of a spleen of mice of the C57BL/6J line at the aggression induced by a social stress//the Bulletin of experimental biology and medicine.–2015.– V 160.–№ 11.– P.–631–634.]
5. Никитина В. Б., Ветлугина Т. П., Лобачева О. А., Невидимова Т. И., Стоянова И. Я. Система иммунитета и психологическая защита в механизмах психоэмоционального стресса // Международный журнал экспериментального образования. 2017. № 5. С. 116–117. [Nikitina V. B., Vetlugina T. P., Lobacheva O. A., Nevidimova T. I., Stoyanova I. Ya. The system of immunity and psychological protection in mechanisms of a psychoemotional stress//the International magazine of experimental education. 2017.–№ 5. P.– 116–117.]
6. Ветлугина Т. П., Никитина В. Б., Лобачева О. А., Невидимова Т. И. Основы клинической психонейроиммунологии. Учебно-методическое пособие / Томск, 2014. [Vetlugina T. P., Nikitina V. B., Lobacheva O. A., Nevidimova T. I. Fundamentals of clinical

- psychoneuroimmunology. Educational and methodical grant. — Tomsk, 2014.]
7. *Rotenberg V.S.* Search activity concept: relationship between behavior, health and brain functions. *Activitas Nervosa Superior*. 2009; 51 (1): 12–44.
  8. *Маркова Е. В., Абрамов В. В., Козлов В. А.* Имунокомпетентные клетки и регуляция поведения у животных // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. — 2007. Т. 27. — № 2. — С. 6–9. [*Markova E. V., Abramov V. V., Kozlov V. A.* Immunocompetent cages and regulation of behavior at animals // the Bulletin of the Siberian office of the Russian Academy of Medical Science. — 2007. Т. 27. — № 2. — Р. — 6–9.]
  9. *Маркова Е. В., Княжева М. А., Козлов В. А.* Клеточные механизмы нейроиммунных взаимодействий в регуляции ориентировочно-исследовательского поведения // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. — 2013. — № 1 (76). — С. 49–52. [*Markova E. V., Knyazheva M. A., Kozlov V. A.* Kletochnyye mechanisms of neuroimmune interactions in regulation of approximate and research behavior // the Siberian messenger of psychiatry and narcology. — 2013. — № 1 (76). — Р. — 49–52.]
  10. *Маркова Е. В., Абрамов В. В., Короткова Н. А., Козлов В. А.* Влияние трансплантации иммунокомпетентных клеток на ориентировочно-исследовательское поведение и экспрессию генов цитокинов в головном мозге животных // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2006. — Т. 142. — № 9. — С. 309–312. [*Markova E. V., Abramov V. V., Korotkova N. A., Kozlov V. A.* Influence of transplantation of immunocompetent cages on approximate and research behavior and an expression of genes of tsitokin in a brain of animals // Bulletin of experimental biology and medicine. — 2006. — Т. 142. — № 9. — Р. — 309–312.]
  11. *Маркова Е. В., Короткова Н. А., Абрамов В. В., Козлов В. А.* Регуляция поведенческих реакций у мышей путем трансплантации иммунокомпетентных клеток // Российский иммунологический журнал. — 2004. — Т. 9. — № S1. — С. 90. [*Markova E. V., Korotkova N. A., Abramov V. V., Kozlov V. A.* Regulation of behavioural reactions at mice by transplantation of immunocompetent cages // Russian journal of immunology. — 2004. — Т. 9. — № 9. — Р. — 90.]
  12. *Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. П.* // Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М., 1991: 399. [*Buresh Ya., Bureshova O., Houston J. P.* “Methods and Basic experiments in Studies of the Brain and Behavior.” Vysshaya Shkola, Moscow (1991): 119–122.]
  13. *Маркова Е. В., Княжева М. А., Рюмина Т. В., Козлов В. А.* Особенности функционирования клеток иммунной системы у особей с агрессивно- и депрессивноподобными типами поведения // В мире научных открытий. — 2014. — № 8 (56). — С. 131–147. [*Markova E. V., Knyazheva M. A., Ryumina T. V., Kozlov V. A.* Features of functioning of cages of the immune system at individuals with aggressive and depressivopodobny types of behavior // In the world of discoveries. — 2014. — № 8 (56). — Р. — 131–147.]
  14. *Маркова Е., Княжева М., Шущпанова Т.* Neuroleptic effect in aggressive mice after the transplantation of immune cells treated in vitro with chlorpromazine // *European Psychiatry*. — 2016. — Т. 33. — № S. — С. 263.
  15. *Cunningham A. J.* A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells. *Nature*. 1965 Sep 4; 207(5001): 1106–1107
  16. *Yoshikai Y., Miake S., Matsumoto T., et al.* Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed footpad reaction to SRBC in mice. // *Immunol.* — 1979. — V. 38. — N.3. — P. 577–583.

## PSYCHOPHYSIOLOGICAL INDICATORS IN MICE RECIPIENTS AFTER MODULATED IMMUNE CELLS TRANSPLANTATION

© 2019 E. V. Serenko\*, M. A. Knyazheva

\*E-mail: [serenko.evgeniy@mail.ru](mailto:serenko.evgeniy@mail.ru)

Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental  
and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

Received: 18.05.2019. Accepted: 24.06.2019

This article deals with the problem of the regulatory relationships of the main adaptive systems of the body, immune and nervous. Increasing evidence suggests that the immune system is able to have a coordinating influence on the behavior and emotional responses of animals and humans. Exploratory behavior is one of the most important types of behavior, which provides the individual with knowledge of the environment and is an essential psychological mechanism of adaptation of higher vertebrates. The purpose of the article was to analyze the psychophysiological indicators in experimental animals after transplantation of immune cells, the functional activity of which was in vitro modulated by the treatment with a psychoactive substance. It was demonstrated that in recipient mice after transplantation of modulated with aminazine immune cells exploratory behavioral editing is recorded against the background of cytokines IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 increase in the brain; as well as a decrease in the intensity of the immune response. The presented results show the possibility of using immune cells as model objects for influencing the neuroimmune functional relationship; as well as the promising application of cellular technologies for behavioral patterns editing.

*Key words:* immune cells, aminazine, immune response, brain, cytokines, behavior

### Authors:

**Serenko E. V.**, ✉ postgraduate student, Laboratory of neuroimmunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

Novosibirsk, Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Laboratory of Neuroimmunology. Phone: +7(383) 222-06-72, +79039346786, **E-mail:** [serenko.evgeniy@mail.ru](mailto:serenko.evgeniy@mail.ru);

**Knyazheva M. A.**, postgraduate student, Laboratory of neuroimmunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia.

## ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ НЕОЭПИТОПОВ Fc ФРАГМЕНТОВ IgG ОБЛАДАЮЩИХ ИММУНОСУПРЕССИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ К УДАЛЕНИЮ МОДИФИЦИРУЮЩЕГО АГЕНТА, НЕОБХОДИМОГО ДЛЯ ИХ ФОРМИРОВАНИЯ

© 2019 г. А. Ю. Сидоров<sup>2\*</sup>, Ю. В. Коренчук<sup>2</sup>, Л. В. Бедулева<sup>1,2</sup>,  
И. В. Меньшиков<sup>1,2</sup>, А. С. Терентьев<sup>1,2</sup>, Т. В. Храмова<sup>1,2</sup>

\*E-mail: aneck4@rambler.ru

<sup>1</sup>Удмуртский Федеральный Исследовательский центр Уральского Отделения Российской академии наук, Ижевск, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия

Поступила: 29.05.2019. Принята: 30.06.2019

Fc фрагменты IgG, несущие неоэпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, обладают свойством подавлять аутоиммунные реакции и редуцировать симптомы в модели коллаген-индуцированного артрита крыс. Для индукции на Fc фрагментах IgG неоэпитопов используется модифицирующий агент, который может вызвать нежелательные реакции при введении в организм. Поэтому необходимо его удаление после модификации Fc фрагментов. Целью исследования было выяснить, сохраняются ли на Fc фрагментах IgG неоэпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, после удаления модифицирующего агента необходимого для их формирования. Обнаружено, что очистить Fc фрагменты IgG от модифицирующего агента можно методом эксклюзионной хроматографии на сорбенте Superdex 200. Удаление модифицирующего агента ведет к утрате неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором на Fc фрагментах IgG. Утрата неоэпитопов после удаления модифицирующего агента сопровождается окислением сульфгидрильных групп шарнирной области, имевшихся на Fc фрагментах, несущих исследуемые неоэпитопы. Данный факт свидетельствует о том, что для сохранения на Fc фрагментах IgG неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором, должно поддерживаться восстановленное состояние остатков цистеина шарнирной области и использованный модифицирующий агент создает необходимые для этого условия.

**Ключевые слова:** Fc фрагменты IgG, ревматоидный фактор, неоэпитопы, сульфгидрильные группы, аутоиммунные реакции

DOI: 10.31857/S102872210007268-9

Адрес: 426034, Ижевск, ул. Университетская, 1, ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Сидоров Александр Юрьевич. Тел.: +79641842385

E-mail: aneck4@rambler.ru

**Авторы:**

**Сидоров А. Ю.**, заведующий виварием ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия;

**Коренчук Ю. В.**, магистрант 2 курса направления «Биология», Ижевск, Россия;

**Бедулева Л. В.**, д.б.н., ведущий научный сотрудник Удмуртского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, профессор кафедры иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия;

**Меньшиков И. В.**, д.б.н., главный научный сотрудник Удмуртского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, заведующий кафедрой

иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия;

**Терентьев А. С.**, научный сотрудник Удмуртского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, инженер кафедры иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия;

**Храмова Т. В.**, аспирант кафедры иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», научный сотрудник Удмуртского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Ижевск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Ранее мы обнаружили, что обработка Fc фрагментов IgG восстанавливающими агентами

ведет к появлению у Fc фрагментов иммуносупрессивных свойств, в частности свойства подавлять аутоиммунные реакции. Было показано, что причиной приобретения Fc фрагментами IgG свойства подавлять аутоиммунные реакции является формирование на Fc фрагментах неопитопов под действием восстанавливающих агентов. Также было выяснено, что данные неопитопы распознаются аутоантителами, получившими название регуляторный ревматоидный фактор [1]. Регуляторный ревматоидный фактор — популяция антиидиотипических антител, присутствующих в норме в крови, общим свойством которых является наличие помимо индивидуальных паратопов, общего паратопа специфичного к неопитопам Fc фрагментов IgG [2]. Увеличение уровня регуляторного ревматоидного фактора у экспериментальных животных ассоциировано с устойчивостью к развитию некоторых экспериментально вызываемых аутоиммунных заболеваний и их ремиссией [2]. Иммунизация крыс Fc фрагментами IgG несущими неопитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, вызывает продукцию регуляторного ревматоидного фактора и редуцирует симптомы коллаген-индуцированного артрита [1]. Поэтому лимфоциты, продуцирующие регуляторный ревматоидный фактор можно рассматривать, как потенциальную терапевтическую биомишень при ревматоидном артрите, а Fc фрагменты, стимулирующие его продукцию, как средство лечения ревматоидного артрита. Модифицирующий агент, используемый для индукции на Fc фрагментах IgG неопитопов, может вызвать нежелательные реакции при введении в организм, поэтому необходимо его удаление после модификации. Однако удаление модифицирующего агента может вести к утрате сформированных неопитопов на Fc фрагментах IgG.

**Целью исследования** было выяснить сохраняются ли неопитопы после удаления модифицирующего агента, необходимого для их формирования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

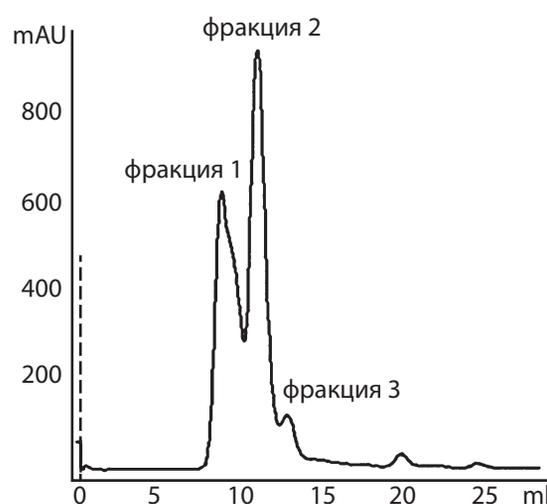
Fc фрагменты IgG человека получали методом папаинового протеолиза Ig G. Очистку Fc фрагментов IgG проводили методами эксклюзионной хроматографии на колонке Sephacryl 26/400 и аффинной хроматографии на protein G и protein A сефарозе. Чистоту оценивали методом электрофоретического анализа в ПААГ.

Для формирования неопитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором, Fc фрагменты обрабатывали модифицирующим агентом. Наличие эпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором, на Fc фрагментах IgG определяли методом торможения реакции агглютинации танализованных эритроцитов, нагруженных IgG, вызванной сывороткой содержащей регуляторный ревматоидный фактор. Контролем служили препараты нативного IgG и забуференный физиологический раствор.

Чистоту Fc фрагментов IgG после удаления модифицирующего агента и состав получаемых при очистке фракций определяли методом электрофоретического анализа в ПААГ в диссоциирующих и диссоциирующих восстанавливающих условиях. Количество сульфгидрильных групп определяли методом Элмана.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Методом эксклюзионной хроматографии на сорбенте Superdex 200 смесь модифицирующего агента и Fc фрагментов IgG человека, несущих неопитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, удалось разделить на три фракции. Хроматографический профиль, полученный при разделении смеси Fc фрагментов и модифицирующего агента представлен на **Рисунке 1**. Первая фракция представлена белками с молекулярной массой более 150 кДа, вторая — 100–40 кДа, третья — менее 40 кДа.



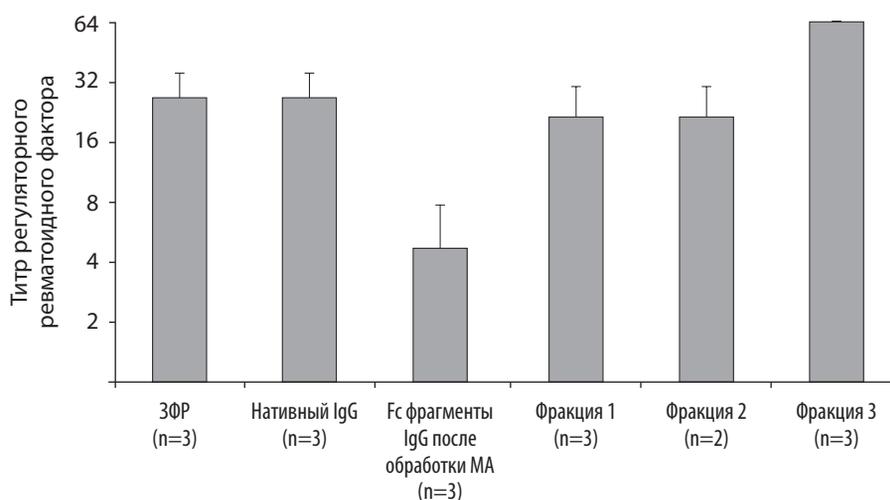
**Рисунок 1.** Эксклюзионная хроматография на колонке Superdex 200 10/300 смеси Fc фрагментов IgG человека, несущих неопитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, и модифицирующего агента.

Электрофоретический анализ фракций в градиентном ПААГ (3–15%) в диссоциирующих и диссоциирующих восстанавливающих условиях, показал, что первая фракция представлена полимерами Fc фрагментов, вторая – мономерами Fc фрагментов, третья содержала модифицирующий агент. Таким образом, эксклюзионная хроматография на сорбенте Superdex 200 позволяет эффективно удалять модифицирующий агент из смеси с Fc фрагментами IgG человека и получить Fc фрагменты IgG чистотой >95% (по данным электрофоретического анализа в ПААГ). Кроме того, хроматографический анализ показал, что Fc фрагменты IgG после обработки модифицирующим агентом находятся как в мономерной, так и в полимерной формах. Чувствительность полимеров Fc фрагментов к 2-меркаптоэтанолу свидетельствует о том, что они образованы на основе межмолекулярных дисульфидных связей.

Наличие неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором, на Fc фрагментах IgG человека до и после удаления модифицирующего агента было изучено методом торможения реакции агглютинации танизированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов, вызванной регуляторным ревматоидным фактором. Эпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, имевшиеся на Fc фрагментах после обработки модифицирующим агентом (Рисунок 2), не обнаружены ни на полимерах Fc фрагментов IgG

человека, содержащихся в первой фракции, ни на мономерах Fc фрагментов IgG человека, содержащихся во второй фракции, полученных эксклюзионной хроматографией на сорбенте Superdex 200 (Рисунок 2). В составе третьей фракции, содержащей модифицирующий агент, также не выявлено носителей неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором (Рисунок 2). Таким образом, Fc фрагменты IgG несущие неоэпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, утратили данные эпитопы после удаления модифицирующего агента из смеси с Fc фрагментами. Следовательно, модифицирующий агент необходим не только для формирования неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором, на Fc фрагментах IgG человека, но и их сохранения.

Исследование количества SH групп показало, что на Fc фрагментах IgG человека, несущих неоэпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, приходится в среднем  $2,89 \pm 0,74$  SH группы. После удаления модифицирующего агента из смеси с Fc фрагментами IgG человека методом эксклюзионной хроматографии на сорбенте Superdex 200 количество свободных сульфгидрильных групп на Fc фрагментах IgG человека во фракции полимеров составило  $0,43 \pm 0,18$  SH группы на молекулу Fc, во фракции мономеров  $0,11 \pm 0,05$  SH групп на молекулу Fc фрагментов. Результаты представлены на Рисунке 3. Таким образом, утрата Fc фраг-



**Рисунок 2.** Ингибирование агглютинации танизированных нагруженных IgG человека эритроцитов, вызванной регуляторным ревматоидным фактором, образцами Fc фрагментов IgG человека. Результаты представлены как среднее  $\pm$  SD. n- количество независимо полученных образцов. МА-модифицирующий агент. ЗФР – забуференный физиологический раствор.

ментами неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором, после удаления модифицирующего агента, сопровождается окислением сульфгидрильных групп.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружено, что очистить Fc фрагменты IgG от модифицирующего агента, необходимого для формирования на Fc фрагментах неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором, можно методом эксклюзионной хроматографии на сорбенте Superdex 200. Удаление модифицирующего агента ведет к утрате неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором на Fc фрагментах IgG. Утрата неоэпитопов после удаления модифицирующего агента сопровождается окислением сульфгидрильных групп шарнирной области, имевшихся на Fc фрагментах, несущих неоэпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором. Так, если Fc фрагменты IgG экспонирующие неоэпитопы содержат около 3 свободных SH групп, то после удаления модифицирующего агента и утраты неоэпитопов в среднем обнаруживается менее 1 группы на молекулу Fc фрагментов. Данный факт свидетельствует о том, что для сохранения на Fc фрагментах IgG неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором, должно поддерживаться восстановленное состояние остатков цистеина шарнирной области и использованный модифицирующий агент создает необходимые для этого

условия. Так как используемый модифицирующий агент может при введении в организм вызывать нежелательные реакции, необходим поиск такого модифицирующего агента, который обладает свойством индуцировать формирование неоэпитопов распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором на Fc фрагментах, но безопасен для организма человека.

### ВЫВОДЫ

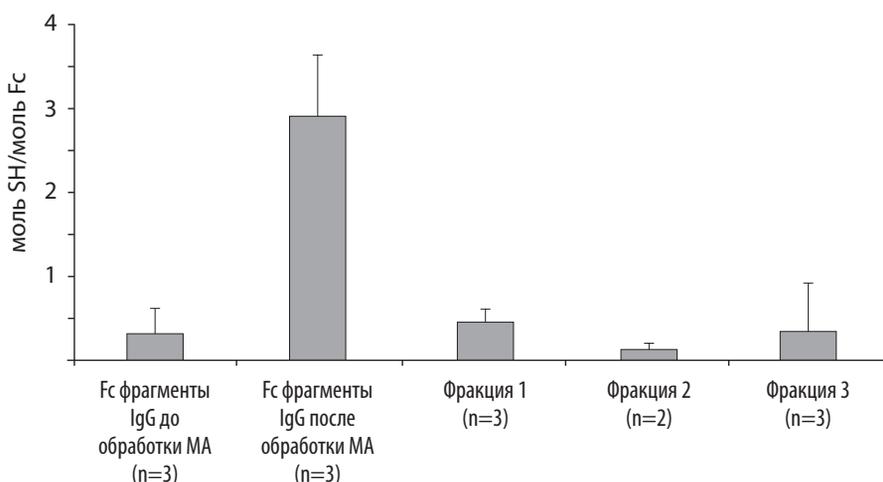
1. Очистка Fc фрагментов IgG, несущих неоэпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, от модифицирующего агента, необходимого для их формирования, ведет к утрате исследуемых неоэпитопов и потере Fc фрагментами иммуносупрессивных свойств.

2. Для сохранения на Fc фрагментах IgG неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором, должно поддерживаться восстановленное состояние остатков цистеина шарнирной области и использованный модифицирующий агент создает необходимые для этого условия.

(Работа выполнена в рамках научного проекта РФФИ № 18–315–00424, и поддержана Стипендией Президента Российской Федерации № СП-1630.2018.4)

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Сидоров А. Ю., Бедулева Л. В., Меньшиков И. В., Терентьев А. С., Столярова Е. Ю., Абишева Н. Н. Fc фрагменты IgG как индуктор регуляторного рев-



**Рисунок 3.** Количество свободных SH групп на Fc фрагментах IgG человека. Результаты представлены как среднее  $\pm$  SD. n – количество независимо полученных образцов. МА-модифицирующий агент. Фракции 1, 2, 3 – фракции полученные при разделении смеси Fc фрагментов и МА методом эксклюзионной хроматографии. Фракция 1 и 2 содержат полимеры и мономеры Fc фрагментов IgG соответственно, фракция 3 – МА.

матоидного фактора и перспективный терапевтический агент для лечения ревматических заболеваний. 2017. Международный журнал биологических макромолекул, 95, 938–945. [Sidorov A., Beduleva L., Menshikov I., Terentiev A., Stolyarova E., Abisheva N. Fc fragments of immunoglobulin G are an inducer of regulatory rheumatoid factor and a promising therapeutic agent for rheumatic diseases. 2017. International Journal of Biological Macromolecules, 95, 938–945].

2. Бедулева Л. В., Меньшиков И. В., Столярова Е. Ю., Фомина К. В., Лобанова О. В., Иванов П. А., Терентьев А. С. Ревматоидный фактор в идиотипической регуляции аутоиммунитета. Международный журнал ревматических заболеваний. 2015, 18, 408–420. [Beduleva L., Menshikov I., Stolyarova E., Fomina K., Lobanova O., Ivanov P., Terentiev A. Rheumatoid factor in idiotypic regulation of autoimmunity. 2015. Int J Rheum Dis, 18, 408–420.]

## THE STABILITY OF NEOEPITOPES RECOGNIZED BY REGULATORY RHEUMATOID FACTOR AFTER REMOVING THE MODIFYING AGENT REQUIRED FOR THEIR FORMATION

© 2019 A. Yu. Sidorov<sup>2\*</sup>, Yu. V. Korenchuk<sup>2</sup>, L. V. Beduleva<sup>1,2</sup>, I. V. Menshikov<sup>1,2</sup>, A. S. Terentiev<sup>1,2</sup>, T. V. Khramova<sup>1,2</sup>

\*E-mail: aneck4@rambler.ru

<sup>1</sup>Udmurt Federal Research Center, Izhevsk, Russia;

<sup>2</sup>Udmurt State University, Izhevsk, Russia

Received: 29.05.2019. Accepted: 30.06.2019

Fc fragments of IgG exposing neoepitopes recognized by the regulatory rheumatoid factor have the ability to suppress autoimmune reactions and reduce symptoms of rat collagen-induced arthritis. To induce neoepitopes in Fc fragments of IgG a modifying agent is used. This modifying agent can cause undesirable reactions when introduced into the body. Therefore it is necessary to remove it after Fc fragments modifying. The aim of the study was to find out whether neoepitopes recognized by the regulatory rheumatoid factor remain on Fc fragments of IgG after removal of the modifying agent. It has been found that Fc IgG fragments can be purified from a modifying agent by size exclusion chromatography on a Superdex 200. Removal of the modifying agent leads to the loss of neoepitopes recognized by the regulatory rheumatoid factor on Fc IgG fragments. The loss of neoepitopes after the removal of the modifying agent is accompanied by the oxidation of the sulfhydryl groups of the hinge region which were present on Fc fragments carrying the neoepitopes. This fact suggests that in order to preserve on the Fc fragments of IgG neoepitope recognized by the regulatory rheumatoid factor the reduced state of cysteine residues of the hinge region must be maintained and the modifying agent used creates the necessary conditions for this.

*Key words:* Fc fragments of IgG, rheumatoid factor, neoepitopes, sulfhydryl groups, autoimmunity

### Authors:

**Sidorov A. Yu.**, ☒ Head of Vivarium, Udmurt State University, Izhevsk, Russia.

426034, Izhevsk, University St, 1, Udmurt State University. Phone: +79641842385, **E-mail:** aneck4@rambler.ru;

**Korenchuk Yu. V.**, undergraduate student, Udmurt State University, Izhevsk, Russia;

**Beduleva L. V.**, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher, Udmurt Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Professor of Immunology and Cell Biology Department, Udmurt State University, Izhevsk, Russia;

**Menshikov I. V.**, Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher, Udmurt Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Head of Immunology and Cell Biology Department, Udmurt State University, Izhevsk, Russia;

**Terentiev A. S.**, Researcher, Udmurt Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Engineer of Immunology and Cell Biology Department, Udmurt State University, Izhevsk, Russia;

**Khramova T. V.**, Postgraduate Student, Udmurt State University, Researcher of Udmurt Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russia.

## ОЦЕНКА ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНАЦИИ ЛЮДЕЙ ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

© 2019 г. М. В. Силкина\*, А. С. Карцева, О. В. Калмантаева,  
М. М. Рогозин, В. В. Фирстова, И. Г. Шемякин

\*E-mail: marksil@yandex.ru

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»  
Роспотребнадзора, Оболенск, Россия

Поступила: 21.05.2019. Принята: 29.06.2019

Вакцинопрофилактика сибирской язвы в России проводится по эпидемиологическим показаниям 1 раз в год с использованием живой сибиреязвенной вакцины. Основной проблемой является отсутствие метода контроля иммунологической эффективности вакцинации. В статье проанализированы гуморальный и клеточный специфический иммунитет у людей через 10–12 месяцев после иммунизации живой сибиреязвенной вакциной. Показано, что практически у всех вакцинированных доноров в сыворотках крови не были выявлены антитела к протективному антигену (ПА). Однако у всех вакцинированных за исключением одного донора в крови циркулировали Т- и В-лимфоциты, способные усиливать экспрессию активационных рецепторов и пролиферативную активность лимфоцитов *in vitro* в присутствии ПА. Полученные данные позволяют предположить, что в отдаленные сроки после вакцинации против сибирской язвы сохраняется специфический клеточный иммунитет.

**Ключевые слова:** *B. anthracis*, антитела, CD69, CD30, лимфоциты, пролиферация, протективный антиген, вакцина

DOI: 10.31857/S102872210007270-2

Адрес: Оболенск, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Силкина Марина Владимировна.

Тел.: +7 496 731 20 84; E-mail: marksil@yandex.ru

Авторы:

**Силкина М. В.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Карцева А. С.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Калмантаева О. В.**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Рогозин М. М.**, стажер-исследователь ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Фирстова В. В.**, д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Шемякин И. Г.**, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время специфическая профилактика сибиреязвенной инфекции в России и странах ближнего зарубежья осуществляется с использованием вакцины живой сибиреязвенной сухой для подкожного и скарификационного применения (серия 265, Киров). Зарубежом существует две вакцины против сибирской язвы человека AVA (anthrax vaccine adsorbed), одобренная для использования в США, и AVP (anthrax vaccine precipitated), лицензированная в Великобритании. Обе они являются химическими вакцинами. Эффективность иммунизации химическими вакцинами проводят на основании выявления токсиннейтрализующих антител. Однако через год после иммунизации химическими вакцинами у большинства людей в крови не детектируются специфические антитела, а сыворотки серопозитивных доноров не способны нейтрализовать действие летального токсина (ЛТ) сибирской язвы [1, 2].

Попытки оценить иммунологическую эффективность иммунизации живой сибиреязвенной

вакциной не принесли успеха. В экспериментах на животных, привитых сибиреязвенной вакциной, было показано, что титры антител сывороток их крови не соответствовали степени защиты животных от сибиреязвенной инфекции и не коррелировали с напряженностью иммунитета. Среди иммунизированных живой сибиреязвенной вакциной выявлялось 13% серонегативных доноров [1]. У серопозитивных доноров уровень антител к ПА падал в течение 6 месяцев. Аналогичная картина наблюдалась у людей, переболевших сибирской язвой, в крови которых также долго не циркулировали специфические антитела [3].

На мышинной модели было показано, что защита от сибиреязвенной инфекции зависит от высвобождения  $IFN\gamma$  Th1 клетками [4]. В связи с этим логично предположить, что в поддержании иммунологической памяти участвует не только гуморальное звено иммунитета, но и клеточное. Вследствие этого возникает необходимость в поиске новых методов оценки иммунологической памяти после вакцинации людей против сибирской язвы. Одним из подходов может стать оценка Т- и В-клеточного звена иммунитета.

**Цель исследования** – проанализировать гуморальный и клеточный иммунитет к возбудителю сибирской язвы у людей, иммунизированных вакциной сибиреязвенной живой сухой.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

У доноров, многократно иммунизированных вакциной сибиреязвенной живой сухой для подкожного и скарификационного применения (серия 265, Киров), брали цельную кровь в вакуумные пробирки Vacuette (Greiner-Bio-One, Австрия) с лития гепарином для последующего выделения мононуклеаров и активатором свертывания крови для получения сыворотки. Интервал между последней вакцинацией донора и включением его в исследование составлял 10–12 месяцев. Контролем выступала группа доноров (6 человек), не иммунизированных и ранее не болевших сибирской язвой.

Рекомбинантный белок ПА *B. anthracis* получали в системе экспрессии *E. Coli* штамма BL21(DE3), трансформированные экспрессионной плазмидой pET22b(+) (Novagen, Merck, США).

В сыворотках крови доноров определяли титры антител к ПА *B. anthracis* методом твердофазного иммуноферментного анализа [5].

Учет результатов производили на спектрофотометре Smart Spec Plus (BIO-RAD, США) при длине волны 492 нм.

Из гепаринизированной крови доноров выделяли мононуклеарные клетки на градиенте плотности Histopaque-1,077 (Sigma, США) с последующей инкубацией их в 96-луночном планшете. Для рестимуляции клеток в экспериментальные лунки вносили раствор ПА (10 мкг/мл), в лунки отрицательного контроля вносили среду RPMI 1640 (ПанЭко, Россия), а в лунки положительного контроля – 5 мкг/мл ConA (Sigma, США).

Для оценки пролиферативной активности лимфоцитов клетки предварительно окрашивали 6-карбоксихлорофлуоресцеином диацетатом (CFSE) в соответствии с инструкцией производителя (BD eBioscience, США).

Фенотипирование лимфоцитов проводили с использованием моноклональных антител: для выявления субпопуляций Т-клеток – CD3 PerCP, CD4 PE, CD25 APC, CD69 FITC, CD30 PE; для В-клеток – CD19-APC, CD30 PE, CD69 FITC (все производства eBioscience, США) в соответствии с инструкцией производителя. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSAria III (Becton Dickinson, США) с использованием программы BD FACSDiva.

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием пакета программ Excel 2013. Статистический анализ цитометрических данных проводили в программе BD FACS Diva (версия 8.0).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Определение антител к ПА

У 11 из 12 доноров, вакцинированных 10–12 месяцев назад против сибирской язвы, в сыворотках крови не были выявлены антитела к ПА (**Рис. 1**). Только у одного донора титры антител составили 1:400.

### Активация поверхностных маркеров

О количестве активированных Т- и В-лимфоцитов в ответ на добавление к ним *in vitro* ПА судили на основании выявления количества CD69-позитивных клеток (**Табл. 1**). У контрольных (невакцинированных) доноров количество CD69<sup>+</sup> или CD30<sup>+</sup> В- и Т-лимфоцитов при добавлении в среду культивирования ПА не увеличивалось. Из 12-ти доноров у 4-х было выявлено увеличение активированных В-лимфоцитов, и у 7-х – Т-лимфоцитов. Увеличение популяции активированных Т-лимфоцитов происходило

**Таблица 1.** Уровень экспрессии молекул CD69, CD30 на поверхности В- и Т-лимфоцитов после стимуляции ПА

№ донора	Условия инкубирования	Субпопуляции Т-лимфоцитов, %				Субпопуляции В-лимфоцитов, %	
		CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD30 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD30 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup> CD30 <sup>+</sup>
1	Среда	1,6	1,8	1,4	1,8	<b>6</b>	<b>3,6</b>
	ПА	2,3	2	3	2,6	<b>26,3</b>	<b>9,4</b>
2	Среда	3,3	2,4	1,3	1,3	<b>1,2</b>	<b>2,1</b>
	ПА	3,4	2,9	1,9	2,6	<b>5</b>	<b>7,1</b>
3	Среда	<b>1,7</b>	1,6	1,5	1,3	4,1	2,3
	ПА	<b>4,4</b>	2,4	1,9	1,5	5,3	2,7
4	Среда	<b>2,1</b>	1,9	<b>1,7</b>	1,2	3,2	<b>2,1</b>
	ПА	<b>7,3</b>	2,7	<b>4,8</b>	1,7	5,5	<b>4,1</b>
5	Среда	<b>3,6</b>	3,4	1	1	5,2	1,5
	ПА	<b>7,8</b>	3,7	1,5	1,5	6,7	2
6	Среда	1,1	1,9	1,4	1,9	<b>7,8</b>	5,3
	ПА	2,8	2,2	1,8	2,1	<b>14,4</b>	5,3
7	Среда	<b>2,8</b>	2,8	1,3	1	6,1	3,3
	ПА	<b>7,3</b>	3,6	1,9	1,7	7,2	5,1
8	Среда	2,1	2,2	2,2	<b>2,3</b>	7,1	5,1
	ПА	3,7	2,4	2,4	<b>12,3</b>	8,5	7,2
9	Среда	6,8	3,5	1,7	1,6	<b>8,1</b>	4
	ПА	7,2	4,5	2,3	1,9	<b>12,5</b>	5,9
10	Среда	<b>1,4</b>	2	1,6	1	2	3,9
	ПА	<b>13,2</b>	2,1	2,1	1,6	2,5	4,4
11	Среда	<b>0,7</b>	1,2	1,4	1,8	2,4	2,3
	ПА	<b>10,3</b>	1,7	2,7	2,5	2,8	2,5
12	Среда	<b>1,5</b>	1,3	<b>2,2</b>	1,2	3,9	3,2
	ПА	<b>16,2</b>	1,8	<b>5,6</b>	1,9	4,3	3,6

только за счет Т-хелперов, но не цитотоксических лимфоцитов. Сравнительный анализ количества CD69<sup>+</sup> Т- и В-лимфоцитов показал, что под влиянием ПА у всех доноров (за исключением одного № 8, вакцинированного 12 месяцев назад) происходила активация либо Т- либо В-лимфоцитов. В присутствии ПА у 3-х доноров отмечали увеличение CD30<sup>+</sup> В-лимфоцитов, у 3-х – CD30<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

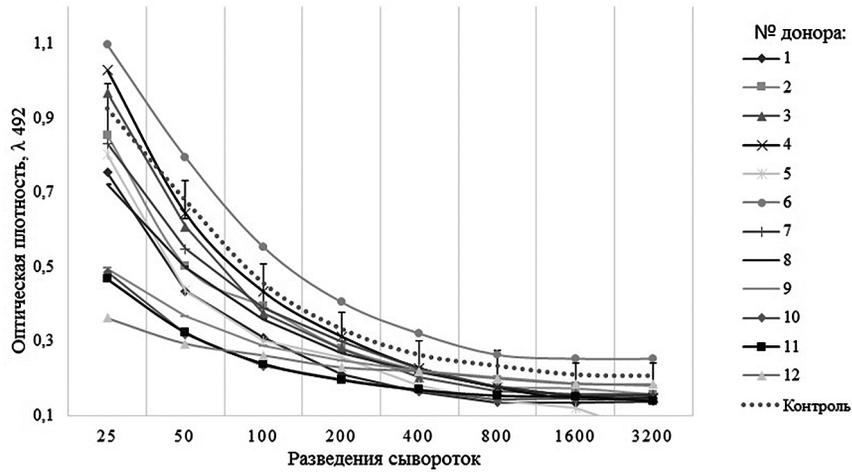
#### *Пролиферативная активность лимфоцитов*

Под влиянием ПА происходило усиление пролиферативной активности Т-лимфоцитов (у 9-ти вакцинированных доноров) и/или В-лимфоци-

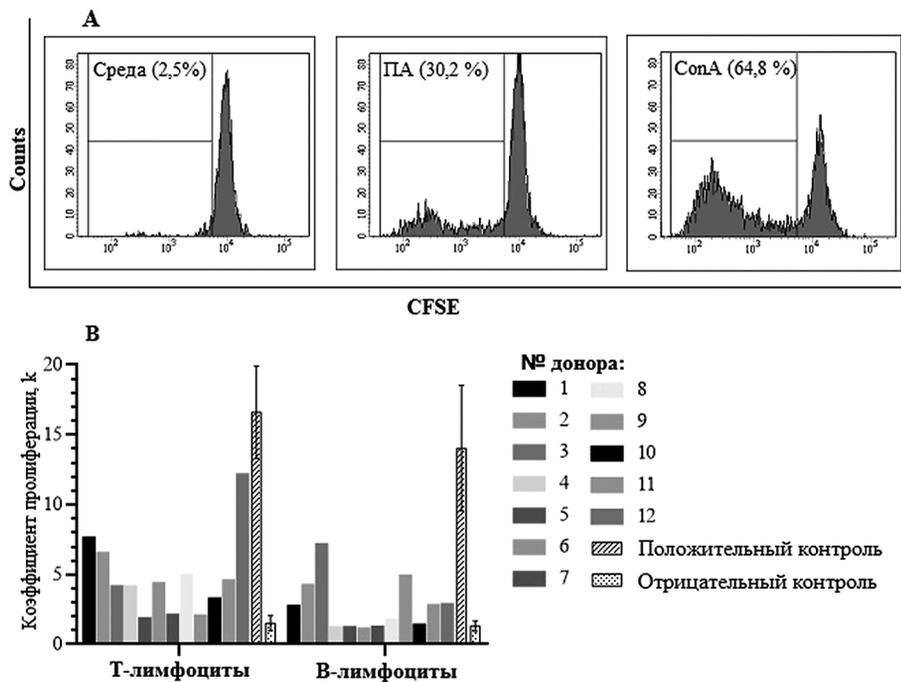
тов (у 6-ти доноров) (**Рис. 2**). Только у одного донора (№ 8) не было выявлено усиления пролиферативной активности лимфоцитов под влиянием ПА. Лимфоциты контрольной группы доноров не усиливали пролиферативную активность в ответ на добавление ПА в среду культивирования.

#### **ОБСУЖДЕНИЕ**

Результаты наших исследований показали, что через 10–12 месяцев после иммунизации против сибирской язвы в сыворотках крови преобладающего большинства доноров не выявляются антитела к ПА, что соответствует мно-



**Рисунок 1.** Титры антител IgG к протективному антигену в сыворотке крови доноров, через 10–12 месяцев после иммунизации вакциной сибирезвеной живой сухой.



**Рисунок 2.** Проллиферативная активность лимфоцитов в ответ на их активацию ПА *in vitro* у доноров, через 10–12 месяцев после иммунизации вакциной сибирезвеной живой сухой.

**Примечание:** А – пример однопараметрических цитофлюорограмм, отражающих пролиферативную активность Т-лимфоцитов донора № 12; В – коэффициент пролиферативной активности лимфоцитов в ответ на их активацию ПА (По оси ординат *k* – соотношение количества пролиферирующих лимфоцитов, активированных ПА, к количеству пролиферирующих лимфоцитов в среде, по оси абсцисс – доноры. Положительный контроль – среднее значение *k* пролиферирующих лимфоцитов в присутствии ConA. Отрицательный контроль – среднее значение *k* пролиферирующих лимфоцитов контрольной группы в присутствии ПА).

гочисленным исследованиям, проведенным ранее [1]. В реакциях *in vitro* мы показали, что под влиянием ПА у всех вакцинированных доноров (за исключением 1 человека) происходит усиление экспрессии рецептора CD69 на поверхности Т- и В-лимфоцитов, что свидетельствует об

активации клеток. Об активации лимфоцитов свидетельствует также усиление их пролиферативной активности в присутствии ПА. У 75% вакцинированных доноров происходило усиленное деление Т-лимфоцитов, а у 50% доноров – В-лимфоцитов. Активация Т- и В-лимфоцитов

под действием ПА, по всей видимости, свидетельствует о наличии в крови специфических Т- и В- клеток памяти, способных запускать каскад иммунных реакций в ответ на взаимодействие со антигеном [6, 7].

В норме у здоровых людей CD30 молекула экспрессируется на поверхности небольшого процента Т-лимфоцитов (0–2%). CD30 рецептор является ко-стимулирующим рецептором, способствующему активации Т-клеток преимущественно по Th2 пути [8]. В наших экспериментах было выявлено усиление экспрессии CD30 молекулы на поверхности лимфоцитов у пяти доноров, что позволяет предположить о гетерогенном пути направленности иммунного ответа в общей популяции людей.

Таким образом, в отдаленные сроки после иммунизации живой сибиреязвенной вакциной в крови у людей циркулируют Т- и В-лимфоциты, способные к быстрому запуску иммунных реакций. У людей, переболевших сибирской язвой, наблюдается аналогичная картина: в отдаленные сроки после инфекции в крови не обнаруживаются специфические антитела, но длительное время сохраняется Th1 клетки, способные отвечать на антигены *B. anthracis* [9].

Анализ когорты сельскохозяйственных рабочих, ранее зараженных кожной формой сибиреязвенной инфекции, показал наличие CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов памяти к антигенам *B. anthracis*. Длительные наблюдения показали, что несмотря на продолжение работы в эндемичных по сибирской язве районах, у этих людей реинфекция практически не наблюдается [10, 11].

Таким образом, несмотря на отсутствие специфических антител у людей сохраняется поствакцинальный клеточный противосибиреязвенный иммунитет, о чем свидетельствуют выявляемые в реакции *in vitro* специфические Т- и В-лимфоциты, способные быстро активироваться под влиянием ПА.

## ВЫВОДЫ

1. Через 10–12 месяцев после иммунизации живой сибиреязвенной вакциной практически у всех доноров в сыворотках крови не выявляются антитела к ПА.

2. Через 10–12 месяцев после иммунизации живой сибиреязвенной вакциной практически у всех доноров в крови циркулируют Т- и/или В-лимфоциты, способные усиливать пролиферацию под влиянием ПА и/или усиливать экспрессию активационного CD69 рецептора на поверхности клеток.

3. В отдаленные сроки после вакцинации у людей сохраняется клеточный противосибиреязвенный иммунитет.

Работа выполнена в рамках Отраслевой программы Роспотребнадзора.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Маринин Л. И., Дятлов И. А., Мокриевич А. Н., Бактеева И. В., Белова Е. В., Борзилов А. И., Комбарова Т. И., Кравченко Т. Б., Миронова Р. И., Попова В. М., Сомов А. Н., Титарева Г. М., Тюрин Е. А., Чекан Л. В., Шишкина О. Б., Шишкова Н. А. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы. ЗАО МП «ГИГИЕНА», Москва, 2009. 304. [Marinin L. I., Dyatlov I. A., Mokrievich A. N., Bakhteeva I. V., Belova E. V., Borzilov A. I., Kombarova T. I., Kravchenko T. B., Mironova R. I., Popova V. M., Somov A. N., Titareva G. M., Tyurin E. A., Chekan L. V., Shishkina O. B., Shishkova N. A. Methods for studying the biological properties of the causative agent of anthrax. ZAO MP "HYGIENA", Moscow, 2009, 304.]
2. Dumas E. K., Gross T., Larabee J., Pate L., Cuthbertson H., Charlton S., Hallis B., Engler R., Collins L. C., Spooner C. E., Chen H., Ballard J., James J. A., Farris A. Anthrax vaccine precipitated induces edema toxin-neutralizing, edema factor-specific antibodies in human recipients. *Clin. and Vaccine Immunology*. 2017, 24 (11), e00165–17.
3. Brenneman K. E., Doganay M., Akmal A., Goldman S., Galloway D. R., Mateczun A. J., Cross A. S., Baillie L. W. The early humoral immune response to *Bacillus anthracis* toxins in patients infected with cutaneous anthrax. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2011, 62 (2), 164–172.
4. Pepper M., Linehan J. L., Pagán A. J., Zell T., Dileepan T., Cleary P. P., Jenkins M. K. Different routes of bacterial infection induce long-lived TH1 memory cells and short-lived TH17 cells. *Nat Immunol.* 2010, 11(1), 83–89.
5. Силкина М. В., Карцева А. С., Зенинская Н. А., Марьян М. А., Рябко А. К., Мунтян Я. О., Фирстова В. В., Шемьякин И. Г., Дятлов И. А. Анализ содержания плазмобластов в крови людей в разные сроки после иммунизации вакциной сибиреязвенной живой сухой. *Иммунология* 2019, 40 (2), 23–29. [Silkina M. V., Kartseva A. S., Zeninskaya N. A., Marin M. A., Ryabko F. K., Muntian Ya. O., Firstova V. V., Shemyakin I. G., Dyatlov I. A. Analysis of plasmoblasts in the human blood at different times after immunization with live anthrax vaccine. *Immunology* 2019, 40 (2), 23–29.]
6. Fang H., Cordoba-Rodriguez R., Lankford C. S. R., Frucht D. M. Anthrax lethal toxin blocks MAPK kinase-dependent IL-2 production in CD4<sup>+</sup> T Cells. *The Journal of Immunology* 2015, 174 (8), 4966–4971.
7. Kachura M. A., Hickie C., Kell S. A., Sathe A., Calacasan C., Kiwan R., Hall B., Milley R., Ott G., Coffman R. L., Kanzler H., Campbell J. D. A CpG-ficoll nanoparticle adjuvant for anthrax protective antigen enhances immunogenicity and provides single-immu-

- nization protection against inhaled anthrax in monkeys. *The Journal of Immunology* 2015, 196 (1), 284–297.
8. *Marín N. D., García L. F.* The role of CD30 and CD153 (CD30L) in the anti-mycobacterial immune response. *Tuberculosis* 2017, 102, 8–15.
  9. *Ascough S., Ingram R. J., Chu K. K., Reynolds C. J., Musson J. A., Doganay M., Metan G., Ozku Y., Baillie L., Sriskandan S., Moore S. J., Gallagher T. B., Dyson H., E. Williamson D., Robinson J. H., Maillere B., Boyton R. J., Altmann D. M.* Anthrax lethal factor as an immune target in humans and transgenic mice and the impact of HLA polymorphism on CD4<sup>+</sup> T cell immunity. *PLoS Pathog.* 2014, 10 (5), e1004085.
  10. *Laws T. R., Kuchuloria T., Chitadze N., Little S. F., Webster W. M., Debes A. K., Saginadze S., Tsertsvadze N., Chubinidze M., Rivard R. G., Tsanova S., Dyson E. H., H. Simpson A. J., Hepburn M. J., Trapaidze N.* A Comparison of the Adaptive Immune Response between Recovered Anthrax Patients and Individuals Receiving Three Different Anthrax Vaccines. *PLOS ONE* 2016, 11 (3), e0148713
  11. *Ingram R. J., Metan G., Maillere B., Doganay M., Ozkul Y., Kim L. U., et al.* Natural exposure to cutaneous anthrax gives long-lasting T cell immunity encompassing infection-specific epitopes. *J Immunol.* 2010, 184 (7), 3814–21.

## ESTIMATION OF IMMUNOLOGICAL EFFICIENCY OF PEOPLE VACCINATED AGAINST ANTHRAX

© 2019 M. V. Silkina\*, A. S. Kartseva, O. V. Kalmantaeva, M. M. Rogozin,  
V. V. Firstova, I. G. Shemyakin

\*E-mail: marksil@yandex.ru

*Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology»  
of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare,  
Obolensk, Russia*

**Received:** 21.05.2019. **Accepted:** 29.06.2019

Vaccine prevention of anthrax in Russia is carried out according to epidemiological indications 1 time per year with the use of live anthrax vaccine. The main problem is the lack of a method to control the immunological efficacy of vaccination. The article presents data that analyzes the anthrax human humoral and cellular immunity among donors vaccinated 10–12 months ago with live anthrax vaccine. It was shown that in the blood serum of the most vaccinated donors did not detect antibodies to the protective antigen (PA). However, in all vaccinated patients (with the exception of one donor) T and B lymphocytes circulated in the blood enhanced proliferative activity and the expression of activation receptors on their cell surface in response to PA *in vitro*. The obtained data suggested that predominantly specific cellular immunity is persisted in the long-term after vaccination against anthrax.

*Key words:* *B. anthracis*, antibodies, CD69, CD30, lymphocytes, proliferation, protective antigen, vaccine

### Authors:

**Silkina M. V.**, ☒ junior researcher, Laboratory of molecular biology, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia. Phone: +74967312084, **E-mail:** marksil@yandex.ru;

**Kartseva A. S.**, junior researcher, Laboratory of molecular biology, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia;

**Kalmantaeva O. V.**, Ph.D., researcher, Laboratory of molecular biology, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia;

**Rogozin M. M.**, junior researcher, Laboratory of molecular biology, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia;

**Firstova V. V.**, Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher of the Laboratory of molecular biology, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia;

**Shemyakin I. G.**, Doctor of Biological Sciences, professor, deputy director for Research, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia.

## КОНЦЕНТРАЦИЯ IgG И IgM ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ С ВИТАМИНОМ D3

© 2019 г. Е. В. Симонян, М. С. Бойко\*

\*E-mail: ri-tochka9@list.ru

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский Государственный Медицинский Университет»  
Минздрава РФ, Челябинск, Россия

Поступила: 26.05.2019. Принята: 28.06.2019

Базисная терапия язвенного колита (ЯК) включает производные 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК), глюкокортикоиды и др. средства, которые имеют побочные эффекты, ограничивающие их применение, в связи с этим необходим поиск и обоснование применения новых средств фармакотерапии. Цель работы — изучить влияния ректальных суппозиторий с витамином D3 на концентрацию в сыворотке IgG и IgM при экспериментальном ЯК. Работа выполнена на 70 крысах линии Wistar. ЯК моделировали ректальным введением 3% раствора оксазолон. Водный раствор витамина D3 в составе ректальных суппозиторий оригинального состава на основе полиэтиленгликоля применяли каждые 12 часов, в группе сравнения по той же схеме применяли ректальные суппозитории с 5-АСК. Концентрацию в сыворотке IgG и IgM определяли иммуноферментным методом с помощью специфических тест-систем на 2, 4 и 6 сутки эксперимента. В ходе работы была выявлено статистически значимое снижение концентрации иммуноглобулинов в условиях применения ректальных суппозиторий с витамином D3 на 4 и 6 сутки экспериментального язвенного колита.

**Ключевые слова:** язвенный колит, витамин D3, IgG, IgM, ректальные суппозитории

DOI: 10.31857/S102872210007271-3

Адрес: 454092 Челябинск, ул. Воровского, д. 64, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский Государственный Медицинский Университет» Минздрава РФ, Бойко Маргарита Сергеевна.

Тел.: 8 982 288 07 18; E-mail: ri-tochka9@list.ru

**Авторы:**

**Симонян Е. В.**, к.фарм.н., доцент, заведующая кафедрой химии и фармации фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Челябинск, Россия;

**Бойко М. С.**, ассистент кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Челябинск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для базисной терапии язвенного колита (ЯК) используют производные 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК), глюкокортикоиды, цитостатики, антицитокининовые и др. препараты с различным механизмом противовоспалительного действия и обладающие широким спектром побочных эффектов: головная боль, слабость, лихорадка, диспепсия,

агранулоцитоз, нарушения всасывания фолиевой кислоты, развитие резистентности к терапии. В связи с этим, актуальным и востребованным в клинической практике является поиск, разработка состава и обоснование применения новых лекарственных средств. В частности, интерес представляет витамин D3, обладающий противовоспалительным, иммуностимулирующим действием, его положительный эффект был описан при других аутоиммунных заболеваниях, таких как сахарный диабет I типа, ревматоидный артрит, системная красная волчанка и др. [1, 2].

Известно, что при ряде аутоиммунных заболеваний, в том числе воспалительных заболеваниях кишечника, уровень IgG и IgM возрастает, что имеет значение в прогрессировании и тяжести течения ЯК и рассматривается как один из ключевых этапов патогенеза [3]. Полагаем, что определение уровня IgM и IgG в сыворотке при экспериментальном ЯК, в том числе

в условиях применения ректальных суппозиторий с 5-АСК, ректальных суппозиторий с витамином D3 позволит, во-первых, проанализировать роль В-клеточного звена иммунитета в патогенезе ЯК, во-вторых, даст провести сравнительную оценку влияния витамина D3 на гуморальные факторы адаптивного иммунитета и рассматривать его как потенциальный терапевтический агент при ЯК.

**Цель работы.** Провести сравнительный анализ влияния витамина D3 в составе ректальных суппозиторий на концентрацию в сыворотке IgG, IgM при экспериментальном ЯК.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 70 белых крысах линии Wistar массой 240–260 г. Сформировано 4 группы: I (n=7) – интактный контроль; II (n=21) – животные с ЯК; III (n=21) – животные с ЯК в условиях применения каждые 12 часов ректальных суппозиторий с 5-АСК; IV (n=21) – животные с ЯК в условиях применения каждые 12 часов ректальных суппозиторий на основе полиэтиленгликоля с 10% водным раствором витамина D3 оригинального состава (тема охраноспособна). ЯК моделировали двухэтапным ректальным введением 3% оксазолон («Sigma-aldrich», USA). На первом этапе модели проводили кожную сенсibilизацию животного нанесением на предварительно выбрившую меж-

лопаточную область 150 мкл 3% раствора оксазолон предварительно растворенного в 100% этиловом спирте. Вторым этапом заключался в ректальном введении на глубину 7–8 см 3% раствора оксазолон предварительно растворенного в 50% этиловом спирте. Верификацию ЯК осуществляли с помощью морфологических и клинических методов. Исследования проводили на 2, 4 и 6 сутки от индукции ЯК. Концентрации IgG и IgM в сыворотке определяли с применением специфических для крыс тест-систем фирмы «ELISA Kit» (Китай) с помощью автоматического иммуноферментного анализатора «Personal LAB» (Италия). Данные обрабатывали с помощью пакета программ «Statistica 10.0 for Windows» с использованием непараметрических критериев Краскелла-Манна-Уитни, Вальда Вольфовитца, Колмогорова-Смирнова. Отличия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено, что при экспериментальном ЯК концентрация в сыворотке IgM возрастает на 2, 4, 6 сутки наблюдения и достигает максимальных значений на 6 сутки, концентрация IgG в сыворотке возрастает на 2, 4 и 6 сутки наблюдения с максимумом на 4 сутки (**Таблица 1**). Применение при экспериментальном ЯК базисной терапии – ректальных суппозиторий

**Таблица 1.** Содержание иммуноглобулинов в сыворотке при экспериментальном язвенном колите и в условиях применения ректальных суппозиторий с витамином D3 (Me(Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>))

Показатели	Ig G, г/л	Ig M, г/л
Группа 1 Интактные (n=7)	3,23(3,05–7,27)	12,71(11,82–17,64)
Группа 2a ЯК 2 сутки (n=7)	10,51(10,32–10,67)*	29,98(29,63–60,58)*
Группа 2b ЯК 4 сутки (n=7)	11,69(10,84–33,33)*	32,45(31,39–35,62)*
Группа 2c ЯК 6 сутки (n=7)	10,58(10,51–16,66)*	34,22(29,63–34,92)*
Группа 3a ЯК+5-АСК 2 сутки (n=7)	6,66(3,36–8,41)#	25,05(25,05–25,04)*#
Группа 3b ЯК+5-АСК 4 сутки (n=7)	7,01(4,48–8,06)\$	22,57(20,46–23,99)*\$
Группа 3c ЯК+5-АСК 6 сутки (n=7)	6,31(5,01–7,79)&	20,81(20,81–21,87)*&
Группа 4a ЯК+VD3 2 сутки (n=7)	9,81(8,23–10,15)*	27,16(26,45–27,16)*
Группа 4b ЯК+VD3 4 сутки (n=7)	5,26(4,13–8,41)\$	21,52(21,16–21,52)*\$
Группа 4c ЯК+VD3 6 сутки (n=7)	9,54(7,53–9,63)*&	20,46(15,52–21,87)&

**Примечание:** \* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) с группой интактных животных; # – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) с группой ЯК на 2 сутки; \$ – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) с группой ЯК 4 сутки; & – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) с группой ЯК на 6 сутки;

с 5-АСК — приводит к снижению концентрации в сыворотке IgM на 2, 4 и 6 сутки с максимальной выраженностью эффекта на 6 сутки наблюдения; концентрация IgG в сыворотке снижается на 2, 4 и 6 сутки наблюдения с максимальной выраженностью эффекта на 6 сутки эксперимента (Таблица 1). Отметим, что концентрация IgG достигает значений в группе интактных животных на 6 сутки. Концентрация IgM не достигает значений в группе интактных животных во все сроки наблюдения.

Нами разработан состав и проведен комплекс фармакотехнологических исследований новой лекарственной формы с витамином D3 — ректальных суппозиторий (тема охраноспособна). Применение у крыс ректальных суппозиторий с витамином D3 приводит к снижению концентрации в сыворотке IgM на 4 и 6 сутки наблюдения, с максимальным эффектом на 6 сутки. Концентрация IgG в сыворотке снижается на 4 и 6 сутки, с максимальным эффектом на 4 сутки эксперимента (Таблица 1).

## ОБСУЖДЕНИЕ

При экспериментальном ЯК установлено повышение концентрации в сыворотке IgG и IgM, что отражает роль Th2-зависимого иммунного ответа в патогенезе повреждения клеток слизистой оболочки толстого кишечника. Известно, что CXCL8, ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-8 и др. цитокины активируют миграцию, адгезию, дегрануляцию, генерацию активных форм кислорода в фагоцитах, хемотаксис Т-лимфоцитов, дифференцировку В-клеток, секрецию иммуноглобулинов, подавление Th1-зависимых реакций, что сопровождается деструктивными изменениями слизистой оболочки толстого кишечника, локальными и системными клиническими проявлениями при ЯК [4].

Продемонстрированный нами при экспериментальном ЯК иммуностимулирующий эффект 5-АСК в виде снижения продукции иммуноглобулинов при локальном применении отражает известный механизм подавления продукции провоспалительных медиаторов, включая лейкотриены, интерлейкин-1 $\beta$ , 6, ИЛ-8, ФНО- $\alpha$ , миграции и киллинговых функций фагоцитов, снижение Th2-зависимых реакций [5].

Новыми являются сведения об иммуномодулирующих свойствах витамина D3 в составе ректальных суппозиторий при ЯК. Полагаем, что данный факт обусловлен участием витамина D3 в регуляции пролиферации и дифференциров-

ки клеток, в том числе, иммунокомпетентных клеток. Открытие рецепторов для витамина D3 (VDR) на клетках иммунной системы (активированных Т-лимфоцитах, макрофагах, незрелых лимфоцитах тимуса и зрелых CD8-клетках) предполагает его участие в функционировании иммунной системы, реализации иммунного ответа, в том числе при патологии [6]. Показано, что витамин D3 непосредственно модулирует пролиферацию Т-лимфоцитов, подавляет развитие Th17-клеток, замедляет дифференцировку В-клеток-предшественников в плазматические клетки, ингибирует продукцию Th1-ассоциированных цитокинов и молекул (CD40, CD80 и CD86).

Полученные результаты расширяют сведения об иммуностимулирующих свойствах витамина D3 при локальном применении в составе ректальных суппозиторий при ЯК. Данное исследование является фрагментом комплексной работы по доклиническому изучению и патогенетическому обоснованию применения ректальных суппозиторий с витамином D3 при воспалительных заболеваниях кишечника.

## ВЫВОДЫ

1. При экспериментальном язвенном колите, индуцированном ректальным введением оксазолон, в сыворотке крыс увеличивается концентрация IgG и IgM на 2, 4 и 6 сутки эксперимента. Применение при экспериментальном язвенном колите ректальных свечей с 5-аминосалициловой кислотой приводит к снижению концентрации IgM и IgG на 2, 4 и 6 сутки.

2. Применение при экспериментальном язвенном колите витамина D3 в составе ректальных суппозиторий оригинального состава приводит к снижению концентрации IgG и IgM в сыворотке на 4 и 6 сутки, сопоставимому с таковым после применения стандартной терапии с 5-аминосалициловой кислотой.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мальцев С. В., Рылова Н. В. Витамин D и иммунитет // Практическая медицина. 2015. № 1(86). С. 114–120. [Maltsev S. V., Rylova N. V. Vitamin D and immunity//Applied medicine. 2015. No. 1(86). P/-114–120.]
2. Осиков М. В., Симонян Е. В., Бакеева А. Е., Бойко М. С., Бивалькевич В. А. Экспериментальное моделирование и перспективные направления коррекции гомеостаза при воспалительных заболеваниях // Аспирантский вестник Поволжья. 2018. № . 1–2. С. 153–160. DOI:10.17816/2075-

- 2354.2018.18.153-160 [Osikov M. V., Simonyan E. V., Bakeeva A. E., Quickly M. S., Bivalkevich V. A. Experimental modeling and the perspective directions of correction of a homeostasis at inflammatory diseases//the Postgraduate bulletin of the Volga region. 2018. No. 1–2. P.–153–160. DOI:10.17816/2075-2354.2018.18.153-160
3. Li Jie Lai, Jun Shen, Zhi Hua Ran. Natural killer T cells and ulcerative colitis. Cellular Immunology. Vol. 335. 2019. P. 1–5. DOI: 10.1016/j.cellimm.2018.08.010.
4. Toshifumi HIBI. Pathogenesis and Treatment of Ulcerative Colitis//JMAJ. 2003. Vol. 46. № 6. P. 257–262.
5. R. Ungaro MD, S. Mehandru MD, J.-F. Colombel MD. Ulcerative colitis. The Lancet. 2017. Vol. 389. P. 1756–1770. DOI:10.1016/S0140–6736(16)32126–2
6. Снопов С. А. Механизм действия витамина D на иммунную систему // Медицинская иммунология. 2014. Т16. № 6. С 499–530. [Snopov S. A. Mechanism of effect of Dna vitamin immune system//Medical immunology. 2014. T16. No. 6. P.– 499–530.]

## STUDY OF THE CONTENT OF IgG AND IgM LEVEL IN EXPERIMENTAL ULCER AND IN THE CONDITIONS OF RECTAL SUPPOSITORIES WITH VITAMIN D3

© 2019 E. V. Simonyan, M. S. Boyko\*

\*E-mail: ri-tochka9@list.ru

South Ural State Medical University, Ministry of health of the Russian Federation,  
Chelyabinsk, Russia

Received: 26.05.2019. Accepted: 28.06.2019

Basic therapy of ulcerative colitis (UC) includes 5-aminosalicylic acid derivatives (5-ASA), glucocorticoids, and other drugs that have side effects that limit their use, therefore, the search for and justification of the use of new drugs for pharmacotherapy is necessary. The aim of the work is to study the effects of rectal suppositories with vitamin D3 on serum IgG and IgM concentrations in experimental UC. Work performed on 70 Wistar rats. UC was modeled in two stages: 1 – skin sensitization of an animal with a 3% oxazolone solution, 2 – rectal administration of 3% oxazolone. An aqueous solution of vitamin D3 in the composition of rectal suppositories of the original composition based on polyethylene glycol was used every 12 hours; in the comparison group, rectal suppositories with 5-ASA were used in the same way. The serum concentration of IgG and IgM was determined by ELISA using specific test systems on days 2, 4 and 6 of the experiment. The work revealed a statistically significant decrease in the concentration of immunoglobulins in terms of the use of rectal suppositories with vitamin D3 on days 4 and 6 of experimental ulcerative colitis.

*Key words:* ulcerative colitis, vitamin D3, IgG, IgM, rectal suppositories

### Authors:

**Simonyan E. V.**, Ph.D., Head of the Department of Chemistry and Pharmacy, Pharmaceutical Faculty, South-Ural State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

**Boyko M. S.**, ✉ Assistant of the Department of Pathophysiology, South-Ural State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia.

454092 Chelyabinsk, ul. Vorovskogo, d. 64, South-Ural State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia. Phone: +79822880718, **E-mail:** ri-tochka9@list.ru

## ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ *EX VIVO* У ДЕТЕЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПОЗИЦИИ СТРОНЦИЕМ

© 2019 г. К. Г. Старкова\*, Е. А. Отавина

\*E-mail: skg@fcrisk.ru

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия

Поступила: 23.05.2019. Принята: 30.06.2019

Проведен анализ особенностей спонтанной и индуцированной продукции цитокинов *ex vivo* у детей в условиях экспозиции стронцием. Определяли уровни спонтанной, индуцированной митогеном (фитогемагглютинин 4 мкг/мл, конкавалин А 4 мкг/мл, липополисахарид 2 мкг/мл) и стронцием (0,01 мг/мл) продукции цитокинов в супернатантах цельной периферической крови детей, проживающих в эндемичной зоне экспозиции стабильным стронцием, методом иммуноферментного анализа. При сравнении спонтанной продукции цитокинов клетками периферической крови детей группы наблюдения показано достоверное снижение уровня IL-12 в 3,1 раза, TNF- $\alpha$  в 5,6 раза относительно группы сравнения и отсутствие различий по спонтанному синтезу IL-6, IL-10, IL-17, GM-CSF. В условиях индуцирующего воздействия стронция выявлено снижение продукции TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-17, GM-CSF в 5,0, 1,7, 2,4, 1,6, 5,0 раз соответственно при общем стимулирующем влиянии металла на показатели группы наблюдения, IL-6 в 133,1 раза, IL-12 в 1,4 раза, GM-CSF в 2,2 раза, TNF- $\alpha$  в 1,8 раза. Полученные данные указывают на модулирующее влияние стронция в отношении продукции цитокинов в культурах цельной крови с преимущественно активирующим воздействием на медиаторы провоспалительного действия IL-6, IL-12, GM-CSF, TNF- $\alpha$  и одновременным угнетением экспрессии Th1-цитокинов.

**Ключевые слова:** иммунная регуляция, цитокины, стронций

DOI: 10.31857/S102872210007272-4

Адрес: 614045, Пермь, ул. Монастырская, 82, ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Старкова Ксения Геннадьевна. Тел.: +7(342)2363930.

E-mail: skg@fcrisk.ru

Авторы:

Старкова К. Г., к.б.н., зав. лабораторией иммунологии и аллергологии ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия;

Отавина Е. А., младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и аллергологии ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Необходимость изучения особенностей изменения состояния здоровья детского населения и закономерностей формирования иммунопосредованных нарушений, связанных с воздействием факторов внешнесредового окружения, определяются повышенной чувствительностью

к измененным условиям среды обитания, которые способны инициировать патологические процессы, затрагивающие структурную и функциональную целостность иммунной системы [1, 2].

В районах стронциевых геохимических провинций, отличающихся повышенным содержанием солей стабильного стронция в подземных источниках водоснабжения, у населения выявляются в первую очередь нарушения минерального обмена и патология костной системы. В то же время иммунная система принимает активное участие в регуляции физиологических функций и посредством цитокиновых медиаторов может оказывать существенное воздействие на развитие патологических процессов, в том числе и в костной системе [3, 4].

**Цель исследования** — анализ особенностей спонтанного и индуцированного синтеза цитокинов *ex vivo* у детей в условиях экспозиции стронцием.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Группу наблюдения составили 15 детей в возрасте от 6 до 11 лет, проживающие в эндемичной зоне Пермского края с повышенным содержанием стабильного стронция в подземных водах. Группа сравнения представлена 16 детьми с условно чистой территории. Группы были сопоставимы по полу, возрасту и соматической заболеваемости.

Исследование содержания стронция в пробах крови выполняли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на масс-спектрометре Agilent 7500сх (Agilent Technologies Inc., США) в соответствии с МУК 4.1.3230–14.

Для исследования непосредственного влияния стронция на иммунную регуляцию оценивали экспрессию выработки цитокинов интерлейкина (IL)-6, IL-10, IL-12, IL-17, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора GM-CSF, фактора некроза опухолей (TNF)- $\alpha$  в условиях *ex vivo* с использованием наборов «Цитокин-стимул» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Определяли уровни спонтанной, индуцированной митогеном (фитогемагглютинин 4 мкг/мл, конкавалин А 4 мкг/см<sup>3</sup>, липополисахарид 2 мкг/см<sup>3</sup>) и стронцием (0,01 мг/см<sup>3</sup>) продукции цитокинов в супернатантах цельной периферической крови методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Россия) на анализаторе «Elx808IU» (BioTek, США).

Статистическую обработку результатов проводили методом вариационной статистики с расчетом среднего арифметического (M) и его стандартной ошибки (m). Достоверность различий при сравнении групп по количественным признакам оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия между группами считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты химико-аналитического исследования показали повышенные концентрации стронция в крови обследованных детей, достоверно превосходящие уровни в группе сравнения, кратность различий составила в среднем в 3,8 раза ( $0,13 \pm 0,015$  мкг/см<sup>3</sup> и  $0,034 \pm 0,006$  мкг/см<sup>3</sup> соответственно,  $p = 0,000$ ; референтный интервал  $0,01–0,077$  мкг/см<sup>3</sup>).

В условиях эксперимента *ex vivo* (Таблица 1) выявлены особенности влияния экспозиции стронцием на продукцию цитокинов. При оценке спонтанного синтеза медиаторов клетками

периферической крови детей установлено достоверное снижение продукции TNF- $\alpha$  относительно группы сравнения в 5,6 раза ( $p = 0,008$ ). Под воздействием стронция наблюдалось повышение концентрации данного цитокина в обеих группах, однако в группе наблюдения индуцированная стронцием продукция TNF- $\alpha$  была достоверно ниже в 5,0 раз ( $p = 0,001$ ).

Спонтанный уровень IL-12 также достоверно снижался относительно показателей группы сравнения в 3,1 раза ( $p = 0,002$ ), в условиях индуцирующего влияния стронция в группе наблюдения показан стимулирующий эффект при достоверно более низком в 2,4 раза уровне относительно группы сравнения ( $p = 0,048$ ).

Кроме того, в обследуемой группе индуцированная стронцием продукция IL-6 была снижена относительно группы сравнения в 1,7 раза ( $p = 0,047$ ), при этом в присутствии стронция отмечено возрастание секреции цитокина в обеих группах, а кратность стимуляции IL-6, наряду с TNF- $\alpha$ , превышала данный показатель всех исследованных цитокинов.

Отсутствовали достоверные различия в спонтанной продукции и влияние стронция на синтез IL-10, хотя отмечена тенденция к снижению данного цитокина относительно группы сравнения в 1,6 и 1,5 раза соответственно.

Также показано уменьшение индуцированной стронцием продукции IL-17 в группе наблюдения при соотнесении со спонтанным уровнем и группой сравнения (в 1,6 раза,  $p = 0,000$ ), показатели которой достоверно не изменялись в условиях инкубации с металлом.

Отмечен стимулирующий эффект стронция на синтез GM-CSF, более выраженный в группе сравнения, кратность стимуляции составила в 18,7 раз против повышения в 2,2 раза в группе наблюдения, показана достоверность различий в уровне продукции цитокина в 5,0 раз ( $p = 0,018$ ).

В условиях митогенной стимуляции показано достоверное возрастание продукции исследованных цитокинов как в группе наблюдения, так и в группе сравнения, что указывает на высокую функциональную активность и цитокинпродуцирующий потенциал клеток периферической крови обследованных детей. Так, в группе наблюдения кратность повышения индуцированного митогеном синтеза IL-6 относительно спонтанной продукции составила в 28,0 раз ( $p = 0,000$ ), IL-12 в 13,5 раза ( $p = 0,000$ ), IL-17 в 17,1 раза ( $p = 0,008$ ), IL-10 в 14,5 раз ( $p = 0,000$ ), GM-CSF в 14,8 раза ( $p = 0,005$ ), TNF- $\alpha$  в 1121,1 раза ( $p = 0,002$ ).

**Таблица 1.** Спонтанная и индуцированная продукция цитокинов клетками периферической крови детей (эксперимент), пг/см<sup>3</sup>

Показатель продукции цитокинов		Группа наблюдения	Группа сравнения	p <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>	p <sub>3</sub>
IL-6	Спонтанная	542,07±127,52	658,56±102,72	0,480	-	-
	Индуцированная митогеном	15160,0±2290,24	10628,13±1331,90	0,078	0,000	0,000
	Индуцированная стронцием	72173,33±17582,16	120750,0±15626,75	0,047	0,001	0,000
IL-12	Спонтанная	19,21±3,77	57,28±10,28	0,002	-	-
	Индуцированная митогеном	259,49±42,54	336,89±79,48	0,365	0,000	0,006
	Индуцированная стронцием	26,58±5,33	63,78±16,58	0,048	0,030	0,742
IL-17	Спонтанная	2,45±0,40	2,17±0,25	0,545	-	-
	Индуцированная митогеном	41,98±11,70	30,56±5,46	0,330	0,008	0,000
	Индуцированная стронцием	1,52±0,142	2,37±0,08	0,000	0,045	0,435
IL-10	Спонтанная	5,39±0,63	8,37±1,35	0,060	-	-
	Индуцированная митогеном	78,32±11,45	50,19±5,95	0,025	0,000	0,000
	Индуцированная стронцием	8,03±1,46	11,74±5,26	0,515	0,102	0,567
GM-CSF	Спонтанная	3,34±1,03	1,98±0,48	0,230	-	-
	Индуцированная митогеном	49,35±13,14	19,90±2,73	0,012	0,005	0,000
	Индуцированная стронцием	7,35±1,94	37,07±11,35	0,018	0,013	0,007
TNF-α	Спонтанная	8,80±2,175	49,10±12,45	0,008	-	-
	Индуцированная митогеном	9865,89±2249,81	9428,56±1434,28	0,865	0,002	0,000
	Индуцированная стронцием	15,88±3,783	78,64±16,03	0,001	0,047	0,101

**Примечание:** p<sub>1</sub> – достоверность межгрупповых различий относительно группы сравнения, p<sub>2</sub> – достоверность различий относительно спонтанной продукции в группе наблюдения, p<sub>3</sub> – достоверность различий относительно спонтанной продукции в группе сравнения.

В условиях воздействия стронция отмечено преимущественное влияние на показатели группы наблюдения, имеющей предварительную сенсибилизацию к металлу. Все эффекты в отношении исследуемых медиаторов имели выраженную стимулирующую направленность за исключением продукции IL-17, которая в присутствии стронция достоверно снижалась в 1,6 раза (p=0,045), и отсутствия воздействия на синтез IL-10. Показано индуцированное стронцием повышение концентрации IL-6 в 133,1 раза (p=0,001), IL-12 в 1,4 раза (p=0,030), GM-CSF в 2,2 раза (p=0,013), TNF-α в 1,8 раза (p=0,047).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Иммунная система, определяя в значительной степени адаптационный потенциал организма, оказывает регулирующее влияние как на физиологические, так и патологически протекающие процессы. В частности, нарушение обмена

костной ткани может индуцироваться в условиях дисбаланса про- и противовоспалительных цитокиновых медиаторов, связанного с повышенной активностью иммунокомпетентных клеток [5, 6]. Стронций смещает вектор регуляции в сторону активации провоспалительного компонента, таким образом формируя патологические тенденции развития иммуноопосредованных нарушений здоровья в условиях хронического воздействия.

В то же время соединения стронция рассматриваются как потенциальные противовоспалительные факторы, механизм действия которых реализуется, в том числе, через снижение провоспалительной активности цитокинов [7, 8]. Многие исследования направлены на изучение применения стронция (стронция ренелата) в малых дозах в качестве перспективной терапии при различных видах патологических процессов, таких как язвенный колит, цистит, аллергический

ринит, костная резорбция. Известно, что особенности специфических эффектов стронция в значительной степени определяются дозой воздействия. При этом низкие уровни стронция способны стимулировать пролиферацию и остеогенез, тогда как высокие концентрации ингибируют дифференцировку и способствуют апоптозу мезенхиальных стволовых клеток, нарушая процессы костного ремоделирования, в значительной степени опосредованного цитокинами [9, 10].

## ВЫВОДЫ

1. Результаты исследования указывают на возможность модулирующего влияния стронция на продукцию цитокинов в культуре цельной крови, причем иммунокомпетентные клетки обследованных детей группы наблюдения обладали высоким функциональным потенциалом при неспецифической стимуляции митогеном.

2. Особенности сенсibiliзирующего эффекта стронция связаны с активирующим воздействием на цитокины, обладающие провоспалительными свойствами (IL-6, IL-12, GM-CSF, TNF- $\alpha$ ), и могут участвовать в формировании патологических тенденций иммунной регуляции.

3. Стимулирующее действие стронция в отношении провоспалительных цитокинов в группе с предварительной сенсibiliзацией было выражено в достоверно меньшей степени, чем в культурах цельной крови группы сравнения, что указывает на действие компенсаторных адаптивных механизмов, учитывая влияние стронция на процессы ремоделирования костной ткани и участие цитокинов в иммунной регуляции остеометаболизма.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Коновалов И. М. Оценка риска нарушений иммунного статуса в условиях антропогенной нагрузки. Здравоохранение Российской Федерации. 2013, 6, 37–38. [Konovalov I. M. The evaluation of risk of disorders of immune status of population in conditions of anthropotechnogenic burden. Zdravookhraneniye Rossiyskoy Federatsii. 2013, 6, 37–38.]
2. Старкова К. Г., Долгих О. В., Дианова Д. Г., Лебедева Т. М. Иммуномодулирующие эффекты у детей в условиях воздействия стронция при поступлении с питьевой водой. Гигиена и санитария. 2016, 95(1), 63–65. [Starkova K. G., Dolgikh O. V., Dianova D. G., Lebedeva T. M. Immunomodulatory effect in children in conditions of the exposure to strontium due to intake in drinking water. Gigiyena i sanitariya. 2016, 95(1), 63–65.]
3. Симбирцев А. С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека. Медицинский академический журнал. 2013, 13(3), 18–41. [Simbirtsev A. S. Cytokines in the pathogenesis of infectious and noninfectious human diseases. Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal. 2013, 13(3), 18–41.]
4. Dar H. Y., Azam Z., Anupam R., Mondal R. K., Srivastava R. K. Osteoimmunology: The Nexus between bone and immune system. Front. Biosci. (Landmark Ed). 2018, 23, 464–492.
5. Jung S. M., Kim K. W., Yang C. W., Park S. H., Ju J. H. Cytokine-mediated bone destruction in rheumatoid arthritis. J. Immunol. Res. 2014, 2014, 263625.
6. Nakamura M., Uehara S., Nakamura H., Udagawa N. Cytokine-mediated bone resorption. Clin. Calcium. 2014, 24(6), 837–844.
7. Pilmane M., Salma-Ancane K., Loca D., Locs J., Berzina-Cimdina L. Strontium and strontium ranelate: Historical review of some of their functions. Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 2017, 78, 1222–1230.
8. Berksoy Hayta S., Durmuş K., Altuntaş E. E., Yıldız E., Hisarciklio M., Akyol M. The reduction in inflammation and impairment in wound healing by using strontium chloride hexahydrate. Cutan. Ocul. Toxicol. 2018, 37(1), 24–28.
9. Aimaiti A., Maimaitiyiming A., Boyong X., Aji K., Li C., Cui L. Low-dose strontium stimulates osteogenesis but high-dose doses cause apoptosis in human adipose-derived stem cells via regulation of the ERK1/2 signaling pathway. Stem Cell Res. Ther. 2017, 8(1), 282.
10. Huang M., Hill R. G., Rawlinson S. C. Strontium (Sr) elicits odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells (hDPSCs): A therapeutic role for Sr in dentine repair? Acta Biomater. 2016, 38, 201–211.

## FEATURES OF CYTOKINE PRODUCTION *EX VIVO* IN CHILDREN UNDER STRONTIUM EXPOSURE

© 2019 K. G. Starkova\*, E. A. Otavina

\*E-mail: skg@fcrisk.ru

FBUN Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russia

Received: 23.05.2019. Accepted: 30.06.2019

The features of spontaneous and induced synthesis of cytokines *ex vivo* in children under strontium exposure were analyzed. The levels of spontaneous, mitogen-induced (phytohemagglutinin 4 µg/ml, concavalin A 4 µg/ml, lipopolysaccharide 2 µg/ml) and strontium (0.01 mg/ml) cytokine production in supernatants of whole peripheral blood of children living in the endemic area of stable strontium exposure were determined by enzyme immunoassay. When compared to the spontaneous production of cytokines by peripheral blood cells of children in the observation group, we revealed a significant decrease in IL-12 levels by 3.1 times, TNF-α by 5.6 times regarding the comparison group and the absence of differences in the spontaneous synthesis of IL-6, IL-10, IL-17, GM-CSF. Under the conditions of inducing effect of strontium, a decrease in production of TNF-α, IL-6, IL-12, IL-17, GM-CSF was found to be by 5.0, 1.7, 2.4, 1.6, 5.0 times, respectively, at the overall stimulating effect of the metal on the indicators of the observation group, IL-6 by 133.1 times, IL-12 by 1.4 times, GM-CSF by 2.2 times, TNF-α by 1.8 times. The data obtained indicate a modulating effect of strontium on cytokine production in whole blood cultures with a predominantly activating effect on mediators of the pro-inflammatory action of IL-6, IL-12, GM-CSF, TNF-α.

*Key words:* immune regulation, cytokines, strontium

### Authors:

**Starkova K. G.**, ✉ PhD (Biology), Head of the laboratory of immunology and allergology FBSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”, Perm, Russia; 614045 Perm, Monastyrskaya St., 82, FBSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”. Phone: +7(342)2363930, **E-mail:** skg@fcrisk.ru;

**Otavina E. A.**, PhD (Biology), laboratory of immunology and allergology FBSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”, Perm, Russia.

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ТОЛЛ-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 2 У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ РУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

© 2019 г. Д. С. Сташкевич\*, А. Л. Бурмистрова

\*E-mail: stashkevich\_dary@mail.ru

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия

Поступила: 26.05.2019. Принята: 28.06.2019

В работе приведены результаты исследования по распределению частот встречаемости аллелей и генотипов однонуклеотидного полиморфизма 2258 G/A (Arg753Gln) TLR2 у больных ревматоидным артритом русской популяции Челябинской области. Генотипирование осуществлено аллель-специфической ПЦР с последующей детекцией результатов в 3% агарозном геле. Показано, что у больных РА повышена частота встречаемости аллеля 2258\*А и гетерозиготного генотипа G/A TLR2 и снижена частота гомозиготного генотипа по предковому аллелю. Установленная значимость однонуклеотидного полиморфизма 2258 (Arg753Gln) TLR2 для формирования устойчивости/предрасположенности к РА у русских Челябинской области подтверждается сверхдоминантной и доминантной моделям наследования.

**Ключевые слова:** TLR2, ревматоидный артрит, модели наследования, генетический полиморфизм

DOI: 10.31857/S102872210007273-5

**Адрес:** Челябинск, ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет» Сташкевич Дарья Сергеевна.

Тел.: +7 908 069 38 72; E-mail: stashkevich\_dary@mail.ru

**Авторы:**

**Сташкевич Д. С.**, канд. биол. наук, декан биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия;

**Бурмистрова А. Л.**, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой микробиологии, иммунологии и общей биологии, декан биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Toll-подобные рецепторы (TLR) играют важную роль в индукции и регуляции врожденной иммунной системы или адаптивных иммунных реакций как в норме, так и при различных патологиях, в том числе при ревматоидном артрите (РА). Вклад Toll-подобных рецепторов в развитие РА подтверждается различными исследованиями, так например показано, что синовиальные фибробласты пациентов с РА конститутивно экспрессируют TLR1–6, и было продемонстрировано, что TLR2, 3, 4 и 7 активируются в синовиальной ткани РА по сравнению с таковой у пациентов с остеоартрозом и здоровых контрольных пациентов [1]. Активация TLR2 в сино-

виальных фибробластах у больных РА приводила к увеличению продукции большого количества провоспалительных цитокинов, усиление синтеза матриксных металлопротеиназ [2]. Поскольку уровень экспрессии и сила связывания с лигандами за счет аминокислотных замен в распознающем домене находятся под влиянием генетического полиморфизма соответствующих генов [3], то его изучение является перспективным для формирования иммуногенетического профиля больных ревматоидным артритом.

Ген TLR2 локализован на 4 хромосоме 4q32. Известно приблизительно 89 SNPs, одним из наиболее изучаемых в виду функциональной значимости, является функциональный вариант TLR2, состоящий из замены G/A в нуклеотиде 2258 (rs5743708, G2258A), в результате чего происходит аминокислотная замена аргинина (Arg) глутамином (Gln) в позиции 753 белка, которая может быть связана с нарушением функции TLR2 и нарушением иммунного ответа [4].

**Цель:** оценить распределение аллелей и генотипов SNP полиморфизма 2258 G/A (Arg753Gln) TLR2 в группах больных ревматоидным артритом и условно здоровых лиц русской популяции.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа относится к ретроспективному типу исследований «случай-контроль». Исследуемые группы – 74 больных РА, 95 практически здоровых лиц русской популяции [5]. В группу контроля входили потенциальные доноры стволовой клетки ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови». Принадлежность к популяционной группе оценивалась согласно рекомендациям Международного Уоркшоп (1980г, Лос-Анджелес, США). Определение SNP в полиморфном сайте 2258 (rs5743708, G2258A) TLR2 проводилось аллель-специфической ПЦР реактивами ООО НПФ «Литех» (г. Москва) с последующей УФ-детекцией результатов в 3% агарозном геле.

**Статистическая обработка.** В исследовании использовали стандартные для 1 степени свободы критерии: Пирсона ( $\chi^2$ ),  $\chi^2$  с поправкой Йетса, точный двусторонний критерий Фишера, OR с расчетом 95% доверительного интервала. Оценка достоверности различий в распределении частот генотипов согласно моделям наследования и соответствие закону Харди-Вайнберга проводились с использованием онлайн приложения SNPStats. Анализ данных проводился согласно 5 моделям наследования: кодоминантная, доминантная, рецессивная, сверхдоминантная и лог-

аддитивная. Для каждой модели наследования также было рассчитано отношение шансов (OR) и доверительные интервалы для него (CI). Выбор модели наследования осуществлялся с помощью информационного критерия Акаике (AIC). Наиболее вероятная модель наследования имеет наименьшее значение AIC [6].

Во всех случаях различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ , незначимыми при  $p > 0,10$ ; для промежуточных значений  $p$  ( $0,05 > p > 0,10$ ) обсуждали тенденцию к различиям.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Наблюдаемые в исследовании частоты аллелей и генотипов в выборках больных НЯК и условно-здоровых лиц соответствуют ожидаемым согласно закону Харди-Вайнберга.

Особенностью группы больных было накопление носительства аллеля с заменой 2258\*A TLR2 за счет повышения частоты его гетерозиготного генотипа (данные представлены в **Таблице 1**).

Как видно из данных **Таблицы 1**, в группе больных РА чаще встречаются носители редкого аллеля 2258\*A TLR2, что повышает вероятность возникновения ревматоидного артрита почти в 4 раза. Носительство гетерозиготного генотипа G/A может рассматриваться как фактор риска, а гомозиготного (G/G) – как протектор. В про-

**Таблица 1.** Частоты встречаемости аллелей и генотипов G2258A TLR2 в выборках больных ревматоидным артритом и практически здоровых лиц

G2258A	Больные РА n=74,%	Контроль N=95,%	$\chi^2$ , p	OR, 95% ДИ
A	12,8	3,7	8,57; p=0,004	3,85 1,57÷9,43
G	87,2	96,3		
AA	1,3	1,1	p=1,0	-
GA	22,9	5,3	10,0; p=0,002	5,37 1,87÷15,36
GG	75,7	93,7	9,64; p=0,002	0,21 0,079÷0,56

**Таблица 2.** Ассоциация полиморфизма G2258A TLR2 с предрасположенностью к ревматоидному артриту

Модель наследования	Распределение генотипов согласно моделям наследования	Уровень значимости	Критерий Акаике (AIC)
Доминантная	G/G G/A-A/A	$p < < 0,01$	224,4
Рецессивная	A/A G/G-A/A	$p = 0,86$	235,6
Кодоминантная	G/G G/A A/A	$p = 0,0026$	225,8
Сверхдоминантная	G/A G/G-A/A	$p < < 0,01$	223,9

должение анализа вклада данного генетического полиморфизма был проведен анализ моделей наследования, позволяющий судить о типе действия исследуемых генотипов на формирование предрасположенности к ревматоидному артриту, данные представлены в **Таблице 2**.

Таким образом, наиболее вероятны две модели, объясняющие ассоциацию генетического полиморфизма 2258 (Arg753Gln) TLR2 с предрасположенностью к ревматоидному артриту: доминантная и сверхдоминантная. Выбор предпочтительной модели наследования осуществляется с помощью критерия Акаике, согласно которому предпочтительной оказалась сверхдоминантная модель. Однако в этой модели не проявляется эффект действия гомозиготного генотипа по предковому аллелю (2258 G/G). Поэтому мы предполагаем, что фенотипический эффект проявления работы гомозиготного генотипа 2258G/G описывает доминантная, а гетерозиготного генотипа 2258G/A – сверхдоминантная модель.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время накоплено много данных подтверждающих роль Толл-подобных рецепторов, в том числе TLR2, в иммунопатогенезе ревматоидного артрита. Однако результаты исследований, посвященных вкладу генетического полиморфизма TLR2 в восприимчивость к ревматоидному артриту, противоречивы. В одних работах не установлено ассоциации TLR2 и других TLRs с ревматоидным артритом [7], а в других – выявлен вклад SNPs не только в предрасположенность, но и тяжесть течения ревматоидного артрита [8]. Вероятно, это может быть связано с наличием этнических особенностей в распределении частот встречаемости полиморфного варианта 2258\*А TLR2, так например, аллель с заменой 2258\*А TLR2 встречается с частотой в 9–10% в европейских популяциях, не обнаруживается у индийской популяции, ряда монголоидных популяций [1, 7, 8]. Поэтому необходимо учитывать этническое происхождение больных.

Кроме того, в формирование предрасположенности к мультифакторным заболеваниям, в том числе к РА, вносят вклад различные межгенные взаимодействия, приводящие к формированию генных сетей.

Полученные в нашем исследовании данные по ассоциации SNP 2258 (Arg753Gln) TLR2 с ревматоидным артритом связаны с повыше-

нием частоты носительства аллеля с заменой и его гетерозиготного генотипа у больных РА, приводящих, согласно литературным данным, к нарушению иммунного ответа.

### ВЫВОДЫ

1. Показано, что у больных РА повышена частота встречаемости аллеля 2258\*А и гетерозиготного генотипа G/A TLR2.

2. Установлена значимость однонуклеотидного полиморфизма 2258 (Arg753Gln) TLR2 для формирования устойчивости/предрасположенности к РА у русских Челябинской области согласно сверхдоминантной и доминантной моделям наследования.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Coenen M. J., Enevold C., Barrera P. et al. Genetic variants in toll-like receptors are not associated with rheumatoid arthritis susceptibility or anti-tumour necrosis factor treatment outcome. PLoS One 2010, 5(12), doi: 10.1371/journal.pone.0014326
2. Волков М. Ю. Роль Toll-подобных рецепторов и их эндогенных лигандов в патогенезе ревматоидного артрита (обзор литературы). Научно-практическая ревматология 2016, 54(1), 78–85. <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2016-78-85>. [Volkov M. Yu. The role of Toll-like receptors and their endogenous ligands in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (literature review). Scientific and practical rheumatology 2016, 54 (1), 78–85. <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2016-78-85>]
3. Беляева С. В. Гены иммунного ответа и их комбинации в качестве предиктивных маркеров потенциального риска развития активного туберкулеза легких и его клинических фенотипов у представителей русской популяции Челябинской области: автореф дис. ... канд. биол. наук: 14.03.09, Челябинск, 2014, 23 с. [Belyaeva S. V. Immune response genes and their combinations as predictive markers of the potential risk of developing active pulmonary tuberculosis and its clinical phenotypes in representatives of the Russian population of the Chelyabinsk region. Extended abstract of Candidate's thesis: 14.03.09, Chelyabinsk, 2014, 23 p.]
4. Ogus A. C., Yoldas B., Ozdemir T. et al. The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. The journal of rheumatology 2010, 37(5), 905–910. doi: 10.3899/jrheum.090775
5. Сташкевич Д. С. Аллели и генотипы генов основных цитокинов и их межгенные и внутригенные связи в ассоциации с ревматоидным артритом у русской и башкирской популяций.: автореф дис. ... канд. биол. наук: 14.00.36 Челябинск., 2009. 23 с. [Stashkevich D. S. Alleles and genotypes of genes of the main cytokines and their intergenic and intragenic relationships in association with rheumatoid arthritis in

- Russian and Bashkir populations. Extended abstract of Candidate's thesis: 14.00.36 Chelyabinsk., 2009. 23 p.]
6. SNPStats: Your web tool for SNP analysis [Electronic resource] / Institut Català d'Oncologia, 2016. (URL: <https://www.snpstats.net/start.htm?>).
  7. Enevold C., Radstake T. R., Coenen M. J. et al. Multi-plex screening of 22 single-nucleotide polymorphisms in 7 Toll-like receptors: an association study in rheumatoid arthritis. *Genetics and molecular research* 2013, 12(1), 328–334. doi: 10.4238/2013.
  8. Lee Y. H., Bae S. C., Kim J. H., Song G. G. Toll-like receptor polymorphisms and rheumatoid arthritis: a systematic review. *Rheumatology International* 2014, 34(1), 111–116. doi: 10.1007/s00296–013–2666–7

## GENETIC POLYMORPHISM OF TLR2 IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS RUSSIAN POPULATION OF CHELYABINSK REGION

© 2019 D.S. Stashkevich\*, A. L. Burmistrova

\*E-mail: [stashkevich\\_dary@mail.ru](mailto:stashkevich_dary@mail.ru)

*Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia*

**Received:** 26.05.2019. **Accepted:** 28.06.2019

The paper presents the results of a study on the frequency distribution of the occurrence of alleles of single nucleotide polymorphism 2258 G A (Arg753Gln) TLR2 in patients with rheumatoid arthritis of the Russian population of the Chelyabinsk region. Genotyping was performed by allele-specific PCR, followed by detection of the results in a 3% agarose gel. It was shown that in patients with RA, the frequency of occurrence of the allele 2258 \* A and the heterozygous genotype G/A TLR2 was increased and the frequency of the homozygous genotype on the ancestral allele was reduced. The established significance of single nucleotide polymorphism of 2258 (Arg753Gln) TLR2 for the formation of resistance/susceptibility to RA in the Russians of the Chelyabinsk region is confirmed by the overdominant and dominant inheritance models

*Key words:* TLR2, rheumatoid arthritis, inheritance patterns, genetic polymorphism

### Authors:

**Stashkevich D. S.**, ☒ candidate of biological sciences, dean of biological faculty of Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia.

Chelyabinsk Chelyabinsk State University. Phone: +79080693872, **E-mail:** [stashkevich\\_dary@mail.ru](mailto:stashkevich_dary@mail.ru);

**Burmistrova A. L.**, doctor of medical sciences, professor, Head of microbiology, immunology and general biology department of biological faculty of Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia.

## ВЛИЯНИЕ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО $\beta$ 1-ГЛИКОПРОТЕИНА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ И ПРОЛИФЕРАЦИЮ Т-ХЕЛПЕРОВ, ПОЛЯРИЗОВАННЫХ В ФЕНОТИП Th17

© 2019 г. В. П. Тимганова<sup>1\*</sup>, М. С. Бочкова<sup>1</sup>, А. П. Калугина<sup>2</sup>,  
П. В. Храмцов<sup>1,2</sup>, М. Б. Раев<sup>1,2</sup>, С. А. Заморина<sup>1,2</sup>

\*E-mail: timganovavp@gmail.com

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия;

<sup>2</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Поступила: 23.05.2019. Принята: 30.06.2019

Изучали влияние нативного (не рекомбинантного) препарата трофобластического  $\beta$ 1-гликопротеина (ТБГ) на дифференцировку и пролиферацию активированных Т-хелперов 17 типа (Th17). Объектом исследования были изолированные методом иммуномагнитной сепарации культуры «наивных» Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>), которые индуцировали в фенотип Th17 при помощи TCR-активатора и провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$  и IL-6). Показано, что ТБГ снижал процент Th17-клеток в культуре (CD4<sup>+</sup>ROR- $\gamma$ t<sup>+</sup>), и подавлял их пролиферацию, оцениваемую методом дифференциального гейтирования. Таким образом, в используемой экспериментальной модели ТБГ оказывал выраженный подавляющий эффект на дифференцировку и пролиферацию Т-хелперов, поляризованных в фенотип Th17.

**Ключевые слова:** трофобластический  $\beta$ 1-гликопротеин (ТБГ), беременность, CD4<sup>+</sup>- лимфоциты, ИЛ-17, Т-хелперы 17 типа (Th17)

DOI: 10.31857/S102872210007274-6

**Адрес:** Пермь, Голева, 13, 614081, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Тимганова Валерия Павловна. Тел.: +7 (342) 280-77-94.

**E-mail:** timganovavp@gmail.com

**Авторы:**

**Тимганова В. П.**, к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия;

**Бочкова М. С.**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия;

**Калугина А. П.**, магистрант кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия;

**Храмцов П. В.**, к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», доцент кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия;

**Раев М. Б.**, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии «ИЭГМ УрО РАН», профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия;

**Заморина С. А.**, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН», профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Трофобластический  $\beta$ 1-гликопротеин (ТБГ) является онкофетальным белком, который продуцируется клетками цито- и синцитиотрофобласта и обладает иммуносупрессивными свойствами, что обеспечивает его важную роль в отмене антагонистических взаимоотношений матери и плода. Однако, несмотря на то, что концентрация ТБГ в крови беременной женщины преобладает над концентрациями других белков беременности и к III триместру достигает значений 200–400 мкг/мл [1], его эффекты на провоспалительную субпопуляцию интерлейкин-17 (IL-17) – продуцирующих лимфоцитов (Th17) человека изучены недостаточно. Процессы диф-

ференцировки Th17 сопровождаются активной пролиферацией этих клеток [6]. Известно, что физиологическая беременность сопровождается снижением Th17 в периферической крови в сравнении с небеременными женщинами [8]. Повышение уровня Th17, в свою очередь, ассоциировано с патологическими процессами и может приводить к преждевременным родам или спонтанному аборту [9]. Основным транскрипционным фактором Th17 является ROR- $\gamma$ t (retinoic acid receptor (RAR) – related orphan receptor) [7].

Таким образом, целью работы являлась оценка влияния ТБГ на пролиферацию и дифференцировку Т-хелперов, индуцированных в фенотип Th17. Для достижения данной цели, были поставлены следующие задачи:

1. Изучить роль ТБГ в регуляции пролиферации Т-хелперов, индуцированных в фенотип Th17.
2. Оценить влияние ТБГ на дифференцировку Th17, оцениваемую по уровню экспрессии ROR- $\gamma$ t (маркер Th17), в зависимости от пролиферативного статуса клетки.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось согласно Хельсинской Декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., получено разрешение этического комитета «ИЭГМ УрО РАН» (IRB00010009) от 12.06.2016.

*Объект исследования.* В работе использовали мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста ( $n=12$ ). МПК получали центрифугированием в градиенте плотности смеси фиколла-верографина ( $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>) (Германия).

*Выделение CD4<sup>+</sup>-клеток.* Монокультуры CD4<sup>+</sup> Т-клеток получали методом иммуномагнитной сепарации с использованием технологии MACS® («Miltenyi Biotec», Германия) из суспензии МПК. Выделенные клетки ( $1 \times 10^6$  кл/мл) культивировали в 48-луночных планшетах в полной питательной среде (ППС): RPMI-1640 с L-глутамином («Sigma-Aldrich», США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («Sigma», США), 10 мМНерес («Amresco», США) и 100 мкг/мл гентамицина («KRKA», Словения) в течение 72 ч при 37°С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. В работе использовали физиологические концентрации нативного ТБГ (1, 10, 100 мкг/мл), полученного по

авторской технологии [3]. В качестве контроля использовали образец, где вместо белка добавляли ППС. Для индукции лимфоцитов в фенотип Th17 в культуры вносили рекомбинантные цитокины IL-1 $\beta$  и IL-6 (по 10 нг/мл, «Miltenyi Biotec», Германия) [3]. В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали T-Cell Activation/Expansion Kit human (TCR-активатор) («Miltenyi Biotec», Германия) – частицы MACSi Bead™, нагруженные антителами против CD2, CD3, CD28 человека. После 72 ч инкубации оценивали количество Th17 как процент CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов (CD4-FITC, «Miltenyi Biotec», Германия), экспрессирующих транскрипционный фактор ROR- $\gamma$ t (Anti ROR $\gamma$ t-PE, «Miltenyi Biotec», Германия). Экспрессия ROR- $\gamma$ t оценивалась после пермеабиллизации клеток согласно инструкции к буферам («BioLegend», Германия). Измерения проводили на проточном цитометре CytoFLEX S («Beckman Coulter», США).

Для оценки пролиферативного статуса использовали метод дифференциального гейтирования на графике светорассеяния по размеру и гранулярности клеток. Так, после 48 часов культивирования CD4<sup>+</sup>-клетки были представлены тремя популяциями: неделяющиеся клетки в характерном для них регионе, пролиферирующие клетки, образующие характерное смещение вправо и вверх и апоптотирующие клетки [11]. TCR-активация клеток в присутствии провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$  и IL-6) приводила к перераспределению клеток в пользу пролиферирующих. Количество клеток внутри каждой популяции выражали как процент от общего количества клеток. Файлы данных были обработаны в программе CytExpert 2.0 («Beckman Coulter», США).

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 6 при помощи критерия Вилкоксона. Результаты представлены в виде медианы, нижней и верхней квартилей (Me (Q1–Q3)). Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Известно, что основным транскрипционным фактором Th17 является ROR- $\gamma$ t, который индуцируется во время дифференцировки антиген-стимулированных Т-хелперов в направлении Th17 в ответ на IL-6. IL-6, в свою очередь, опосредует свое действие с помощью активации сигнального белка и активатора транскрипции STAT3 [5]. Помимо этого, важным фактором

дифференцировки этих клеток является IL-1 $\beta$ , который может усиливать действие IL-6 и IL-23. Именно из этих факторов складывается стимул для дифференцировки наивных Т-лимфоцитов в Th17 [9]. Для дифференцировки Th17-клеток, как и для любых других Т-хелперов, важны сигналы, поступающие от TCR, и его активация является ключевым фактором в индукции Th17. TCR-активация индуцирует транскрипционные факторы NFAT, NF- $\kappa$ B и AP-1, которые необходимы для продукции провоспалительных цитокинов Th17-клетками. Таким образом, наша экспериментальная система имитирует все необходимые для поляризации Т-хелперов в фенотип Th17 стимулы.

В нашем исследовании самостоятельный эффект поляризации в Th17 (TCR-активация в присутствии провоспалительных цитокинов) заключался в существенном (более, чем в 7 раз) повышении экспрессии ROR- $\gamma$ t Т-хелперами (Табл. 1). При изучении влияния ТБГ на дифференцировку Th17 установлено, что ТБГ в концентрации, соответствующей последнему триместру беременности (100 мкг/мл), подавляет количество CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, экспрессирующих транскрипционный фактор ROR- $\gamma$ t (Табл. 1).

Учитывая, что процессы дифференцировки Th17 сопровождаются активной пролиферацией этих клеток, мы оценили также влияния ТБГ на

пролиферацию активированных Т-хелперов методом дифференциального гейтирования. Установлено, что самостоятельный эффект TCR-активации в присутствии провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$  и IL-6) заключался в существенном увеличении процента пролиферирующих CD4<sup>+</sup>-клеток (с 11,32 (9,32–15,63) до 42,33 (34,03–50,14)), которое сопровождалось одновременным снижением процента не пролиферирующих клеток (с 83,56 (77,85–97,53) до 47,84 (39,47–53,57)), при этом уровень апоптотирующих клеток не изменялся (Табл. 1). В целом, это свидетельствует об адекватной активации CD4<sup>+</sup>-клеток в представленной экспериментальной модели. Важно отметить, что полученные данные согласуются с аналогичными экспериментами, где мы изучали пролиферацию TCR-активированных Т-хелперов в присутствии IL-2 [4].

Установлено, что внесение в культуры активированных лимфоцитов ТБГ в концентрациях 10 и 100 мкг/мл изменяло соотношение пролиферирующих и не пролиферирующих клеток. Так, высокая доза ТБГ снижала процент пролиферирующих Т-хелперов, в то время как концентрации 10 и 100 мкг/мл повышали количество не пролиферирующих клеток (Табл. 1). Таким образом, ТБГ в нашем исследовании прежде всего подавляет пролиферацию активированных CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, индуцированных в фенотип Th17.

**Таблица 1.** Влияние ТБГ на дифференцировку и пролиферативный статус CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, поляризованных в фенотип Th17 (n=11, Me (Q1 – Q3))

% клеток	Контроль (без активаторов)	(+ TCR-активатор, IL-1 $\beta$ , IL-6)			
		Контроль	ТБГ (1 МЕ/мл)	ТБГ (10 МЕ/мл)	ТБГ (100 МЕ/мл)
Не пролиферирующие клетки	83,56 (77,85–97,53)	47,84 (39,47–53,57)*	52,94 (32,32–54,27)	49,22 (34,03–53,09)#	50,24 (31,39–53,88)#
Пролиферирующие клетки	11,32 (9,32–15,63)	42,33 (34,03–50,14)*	36,49 (32,32–39,65)	39,39 (33,56–47,00)#	40,68 (31,39–49,79)#
Апоптотирующие клетки	8,12 (7,34–11,45)	9,88 (9,23–12,72)	9,76 (8,83–13,43)	10,23 (9,29–13,67)	10,87 (9,68–12,61)
ROR- $\gamma$ t <sup>+</sup> в общем гейте	1,23 (0,78–2,65)	77,93 (74,39–83,75)*	76,65 (75,32–82,64)	75,77 (73,54–81,56)#	68,15 (64,36–72,74)#
ROR- $\gamma$ t <sup>+</sup> в гейте пролиферирующих клеток	1,02 (0,37–1,89)	80,73 (76,29–83,94)*	80,1 (74,11–82,77)	78,62 (73,48–82,36)	69,28 (65,63–76,06)#
ROR- $\gamma$ t <sup>+</sup> в гейте не пролиферирующих клеток	1,35 (0,65–1,76)	71,51 (63,72–76,26)*	71,59 (63,83–75,80)	69,87 (63,89–73,58)	59,30 (57,50–68,08)#

**Примечание:** \* – достоверные (p < 0,05) по w-критерию Вилкоксона различия между контролем без активатора и контролем с активаторами; # – достоверные (p < 0,05) по w-критерию Вилкоксона различия между контролем с активаторами и экспериментальными пробами.

В заключение мы проанализировали уровень экспрессии ROR- $\gamma$ t в зависимости от пролиферативного статуса клетки — то есть в пролиферирующем и не пролиферирующем гейтах лимфоцитов. Было показано, что ТБГ в высокой концентрации (100 мкг/мл) снижает экспрессию ROR- $\gamma$ t как в пролиферирующих, так и в не пролиферирующих клетках. Это довольно интересный результат, так как не пролиферирующие, долгоживущие клоны Т-хелперов, по-видимому участвуют в формировании иммунной памяти.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что при спонтанных абортах пропорция Th17/Treg повышается в сторону Th17, что сопровождается повышением уровня IL-17A в периферической крови. В то же время, нормальная беременность сопровождается снижением Th17 в периферической крови [9]. Вполне вероятно, что ТБГ, снижая активность этих клеток, оказывает фетопротекторный эффект в ситуации *in vivo*.

Анализируя полученные результаты, очевидно, что низкая концентрация ТБГ (соответствующая I триместру беременности) не оказывает значимых эффектов на дифференцировку Th17, в то время как именно в это время клетки полуаллогенного эмбриона активно экспрессируют антигены МНС отцовского гаплотипа. Этот период опасен с точки зрения самопроизвольных иммунных абортов, однако именно I триместр сопровождается пиковым подъемом уровня хорионического гонадотропина (ХГ) [8]. Известно, что ХГ активно модулирует дифференцировку Treg/Th17, оказывая Treg-стимулирующие и Th17-угнетающие эффекты в аналогичной модели клеток [1]. Вероятно, после снижения уровня ХГ во II–III триместрах, его «эстафету» в модуляции минорных регуляторных субпопуляций (Treg, Th17) принимает на себя ТБГ, концентрация которого в динамике беременности постепенно возрастает [2].

### ВЫВОДЫ

Таким образом, ТБГ в высоких концентрациях, соответствующих II–III триместру беременности оказывает выраженный супрессивный эффект на провоспалительную субпопуляцию Т-хелперов — Th17, который выражается в подавлении пролиферации и снижении уровня экспрессии ROR- $\gamma$ t<sup>+</sup>, ключевого мастер-регулятора этих клеток.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: 01201353248 («ИЭГМ УрО РАН»).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Заморина С. А., Ширшев С. А.* Хорионический гонадотропин — фактор индукции иммунной толерантности при беременности. Иммунология. 2013, 34(2), 105–107. [*Zamorina S. A., Shirshov S. A.* Chorionic gonadotropin — a factor in the induction of immune tolerance during pregnancy. Immunology. 2013, 34 (2), 105–107.]
2. *Посисеева Л. В., Назаров С. Б., Татаринов Ю. С.* 2004. Трофобласт-специфический бета-гликопротеин в акушерстве и гинекологии, ОАО «Издательство Иваново», Иваново, 240 с. [*Posiseeva L. V., Nazarov S. B., Tatarinov Yu. S.* 2004. Trophoblast-specific beta glycoprotein in obstetrics and gynecology, Ivanovo Publishing, OJSC, Ivanovo, 240 p.]
3. *Раев М. Б.* Способ выделения и очистки трофобластического  $\beta$ -1-гликопротеина. Патент РФ № 2367449 от 20.09.2009. / «Изобретения. Полезные модели». — 2009. — № 26. [*Rayev M. B.* A Method for the Isolation and Purification of Trophoblastic B-1-Glycoprotein. Patent of the Russian Federation 2367449, published on 2006, September 20, Bul. 26.]
4. *Черешнев В. А., Тимганова В. П., Заморина С. А., Боцкова М. С., Храмов П. В., Кропанева М. Д., Раев М. Б.* Роль альфа-фетопротеина в дифференцировке регуляторных Т-лимфоцитов. Доклады академии наук, 2017, 477(4), 496–499. [*Chereshnev V. A., Timganova V. P., Zamorina S. A., Bochkova M. S., Khramtsov P. V., Kropaneva M. D., Raev M. B.* The role of alpha-fetoprotein in the differentiation of regulatory T-lymphocytes. Doklady Biological Sciences. 2017. T. 477. C. 496.]
5. *Alisa A., Boswell S., Pathan A. A., Ayaru L., Williams R., Behboudi S.* Human CD4(+) T cells recognize an epitope within alpha-fetoprotein sequence and develop into TGF-beta-producing CD4(+) T cells. J. Immunol., 2008, 180, 5109–5117.
6. *Annunziato F., Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S.* The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. Int Immunol. 2008, 20(11), 1361–1368.
7. *Castro G., Liu X., Ngo K., De Leon-Tabaldo A., Zhao S., Luna-Roman R., Yu J., Cao T., Kuhn R., Wilkinson P., Herman K., Nelen M. I., Blevitt J., Xue X., Fourie A., Fung-Leung W. P.* ROR $\gamma$ t and ROR $\alpha$  signature genes in human Th17 cells. PLoS One 2017, 12 (8): e0181868. doi: 10.1371/journal.pone.0181868.
8. *Cole L. A.* HCG, the wonder of today's science. Reprod. Biol Endocrinol. 2012, 10. 24.
9. *Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M.* Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. Am. J. Reprod. Immunol. 2010, 60(63), 601–610.
10. *Santner-Nanan B., Peek M. J., Khanam R., Richards L., Zhu E., Fazekas de St. Groth. B., Nanan R.*

Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J. Immunol.* 2009, 83(11), 7023–7030.

11. *Timganova V., Bochkova M., Khramtsov P., Kochurova S., Rayev M., Zamorina S.* Effects of Pregnancy-specific  $\beta$ -1-glycoprotein on the Helper T Cell Response. *Arch. Biol. Sci.* 2019, 71(2), 369–378.

## EFFECT OF PREGNANCY-SPECIFIC $\beta$ 1-GLYCOPROTEIN ON THE DIFFERENTIATION AND PROLIFERATION OF TH17-POLARIZED HELPER T CELLS

© 2019 V. P. Timganova<sup>1\*</sup>, M. S. Bochkova<sup>1</sup>, A. P. Kalugina<sup>2</sup>, P. V. Khramtsov<sup>1,2</sup>, M. B. Raev<sup>1,2</sup>, S. A. Zamorina<sup>1,2</sup>

\*E-mail: timganovavp@gmail.com

<sup>1</sup>«Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch Russian Academy of Sciences», Perm, Russia;

<sup>2</sup>Perm State University, Perm, Russia

Received: 23.05.2019. Accepted: 30.06.2019

The effect of the native (non-recombinant) pregnancy specific  $\beta$ 1-glycoprotein (PSG) preparation on the differentiation and proliferation of Th-17 polarized helper T cells was studied. The object of the study was the culture of “naive” helper T cells (CD4<sup>+</sup>) isolated by the immunomagnetic separation. Cells were polarized into the Th17 phenotype using TCR-activator and pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and IL-6). It was shown that PSG had a suppressive effect on the Th17 cell frequency in culture (CD4<sup>+</sup>ROR- $\gamma$ t<sup>+</sup>), and inhibited the proliferation of these cells, as measured by the method of differential gating. Thus, in the experimental model used, PSG had a pronounced suppressive effect on the differentiation and proliferation of T-helpers polarized into the Th17 phenotype.

**Key words:** pregnancy-specific  $\beta$ 1-glycoprotein (PSG), pregnancy, CD4<sup>+</sup>-lymphocytes, IL-17, T-helper 17 type (Th17)

### Authors:

**Timganova V. P.**, ✉ Ph.D. (Biology), junior researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», Perm, Russia.

614081, Perm, st. Goleva, 13, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS». Phone: +7 (342) 280-77-94, E-mail: timganovavp@gmail.com;

**Bochkova M. S.**, Ph.D. (Biology), researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», Perm, Russia;

**Kalugina A. P.**, student of the department of microbiology and immunology of the Perm State University's Faculty of Biology, Perm, Russia;

**Khramtsov P. V.**, Ph.D. (Biology), researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», assistant professor of the department of microbiology and immunology of the Perm State University's Faculty of Biology, Perm, Russia;

**Rayev M. B.**, Ph.D., MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Ecological Immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», professor of the department of microbiology and immunology of the Perm State University's Faculty of Biology, Perm, Russia;

**Zamorina S. A.**, Ph.D., MD (Biology), leading researcher, laboratory of ecological immunology, «Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS», professor of the department of microbiology and immunology of the Perm State University's Faculty of Biology, Perm, Russia.

## ВЛИЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ НА РЕГЕНЕРАТОРНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПЕЧЕНИ ПРИ ОСТРОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

© 2019 г. Н. В. Тюменцева<sup>1,2\*</sup>, Ю. С. Храмцова<sup>1,3</sup>, О. С. Арташян<sup>1,3</sup>, Р. К. Гафарова<sup>1</sup>

\*E-mail: tumen80@mail.ru

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

<sup>2</sup>ГАУЗ Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий» Екатеринбург, Россия;

<sup>3</sup>Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

Поступила: 27.05.2019. Принята: 30.06.2019

Иммунная система играет важную роль в регуляции восстановительных процессов в разных тканях и органах, в том числе и печени. Изменение функционального состояния иммунной системы препаратом полиоксидоний при остром токсическом гепатите не снимает признаки токсического повреждения печени, при этом усиливается миграция лимфоцитов в этот орган. Препарат не оказал значимого положительного влияния на репаративную регенерацию печени, что, возможно, связано с недостаточно длительным или с отсроченным по времени с момента отравления введением препарата.

**Ключевые слова:** токсический гепатит, регенерация, четыреххлористый углерод, полиоксидоний

DOI: 10.31857/S102872210007275-7

**Адрес:** 620002 Екатеринбург, Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (ИИФ УрО РАН), Тюменцева Наталья Валерьевна.

Тел.: +7 922 606 74 49, (343) 374 00 70. E-mail: tumen80@mail.ru

### Авторы:

**Тюменцева Н. В.**, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН; вед. науч. сотрудник центральной экспериментальной лаборатории биотехнологий ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия;

**Храмцова Ю. С.**, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Института иммунологии и физиологии» УрО РАН; доцент департамента биологии и фундаментальной медицины Уральского федерального университета, Екатеринбург, Россия;

**Арташян О. С.**, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Института иммунологии и физиологии» УрО РАН; доцент департамента биологии и фундаментальной медицины Уральского федерального университета, Екатеринбург, Россия;

**Гафарова Р. К.**, мл. науч. сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Института иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия.

## ВВЕДЕНИЕ

Проблема регенерации тканей является одной из ключевых в биологии. Этот процесс обеспечивает тканевой гомеостаз в физиологических условиях и восстановление утраченных структур, нарушенных функций при повреждении. Чрезвычайно важна эта проблема и для медицины, поскольку большинство заболеваний в той или иной степени связаны с повреждением органов, а эффективность проводимой терапии определяется течением репаративных процессов.

В последние годы участились случаи токсического гепатита, связанные с употреблением спиртосодержащих жидкостей, в состав которых входят токсические вещества. Отравления протекают крайне тяжело с поражением печени, при этом отмечается высокая летальность. Недостаточная эффективность терапевтических мероприятий, используемых для лечения острого токсического гепатита, приводит к многочисленным осложнениям (циррозу, энцефа-

лопатии, панкреатиту, поражению почек) [1, 2]. Известно, что иммунная система принимает активное участие в процессах регенерации. Использование различных иммунокорректоров с целью влияния на процессы восстановления в терапии может стать принципиально новым методом лечения многих заболеваний, сопровождающихся повреждением структуры органов и тканей, в том числе и острого токсического гепатита [3].

**Цель исследования:** изучить влияние иммунной системы на регенераторные процессы печени при остром токсическом гепатите.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на 19 беспородных крысах – самцах массой 200–300 г. Условия содержания и обращение с используемыми в эксперименте животными соответствовали Директиве Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации.

Для моделирования острого токсического гепатита использовали четыреххлористый углерод ( $CCl_4$ ). Затравку животных проводили однократно в дозе 50 мг/кг/сутки внутрибрюшинно. В дальнейшем выведение крыс из эксперимента осуществляли с помощью миорелаксанта ардуан (доза 0,08 мг/кг) и обезболивающего препарата кеторол (доза 8 мг/кг) на 1 и 3 сутки. Контролем служили интактные крысы, которые не подвергались воздействию гепатотропного яда.

Для изменения функционального состояния иммунной системы на фоне острого токсического гепатита в эксперименте был использован фармакологический препарат полиоксидоний, занесенный в Регистр лекарственных средств России и относящийся к группе иммуномодуляторов. Полиоксидоний вводили экспериментальным крысам однократно в дозе 0,1 мг/кг внутримышечно на вторые сутки после затравки четыреххлористым углеродом. Животных выводили из эксперимента через 1 сутки, при этом проводили забор крови и печени.

Для анализа периферической крови проводили забор крови из хвостовой вены крысы и исследовали её с помощью гематологического анализатора Celly 70 (Biocode Nucel, Франция). Для биохимического анализа крови использовали автоматизированный биохимический анализатор Cobas Integra 400 plus (Roche Diagnostics, Швейцария).

Для гистологических исследований кусочки печени фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. После стандартной проводки

делали срезы толщиной 3–5 мкм, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином. Проводили патоморфологическое и морфометрическое исследования препаратов печени с подсчетом следующих показателей: размер гепатоцитов, размер ядер гепатоцитов, ядерно-цитоплазматический индекс, количество гепатоцитов на 1 мм<sup>2</sup>, митотический индекс, количество двуядерных клеток на 1000 гепатоцитов.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием непараметрических методов статистики («Statistica 6.0»). Сравнение групп выполняли с использованием критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Общеклиническое исследование крови после введения гепатотропного яда свидетельствует о наличии острого воспалительного процесса в организме экспериментальных животных. Этот процесс характеризуется повышением количества гранулоцитов и СОЭ. Со стороны «красной крови» никаких изменений не наблюдается. Вероятно,  $CCl_4$  на эритроциты не оказывает токсического действия. В тоже время отмечены изменения со стороны системы свертывания крови. Спустя 1 сутки после затравки  $CCl_4$  отмечается достоверное повышение среднего объема тромбоцитов. Этот показатель связан с функциональной активностью тромбоцитов, и, возможно, его повышение может свидетельствовать о кровоизлияниях в организме (Табл. 1).

Наличие острого токсического гепатита подтверждается также биохимическими исследованиями крови. Происходит увеличение уровня АСТ уже на первые сутки после воздействия гепатотропного яда. Белково-синтетическая функция не страдает, так как количество общего белка и альбумина (белок синтезируемый клетками печени) не изменяется по сравнению с интактными животными. Уровень щелочной фосфатазы, которая является ферментом паренхимы печени, также не меняется на все сроки наблюдения. Анализ биохимических показателей выявил, что происходит поражение не только печеночных структур, но и так же клеток поджелудочной железы, о чем свидетельствует увеличение уровня глюкозы на третьи сутки и амилазы на все сроки исследования. Отмечается резкий рост концентрации мочевины и креатинина на первые сутки после затравки, что свидетельствует о токсическом влиянии  $CCl_4$  на почки (Табл. 2).

**Таблица 1.** Показатели периферической крови крыс на разные сроки после затравки  $\text{CCL}_4$  (50 мг/кг) и после введения полиоксидония (0,1 мг/кг)

Показатели	Интактные животные (n=10)	Через 1 сутки (n=3)	Через 3 суток (n=3)	Через 3 суток + полиоксидоний (n=3)
Общее количество лейкоцитов, Г/л	9,91±1,35	11,67±3,93	12,53±1,67	11,37±2,79
Количество лимфоцитов, Г/л	8,22±1,23	8,80±3,42	10,1±1,16	9,57±2,03
Количество средних клеток, Г/л	1,33±0,2	1,73±0,57	1,3±0,2	1,2±0,42
Количество гранулоцитов, Г/л	0,36±0,09	1,13±0,18*	1,13±0,49	0,6±0,4
Количество эритроцитов, Т/л	8,71±0,34	8,11±0,65	8,42±0,27	8,49±0,44
Гемоглобин, г/дл	15,04±0,6	14,63±0,93	15±0,38	14,57±0,9
Гематокрит, %	44,93±1,55	44±3,12	43,5±1,5	42,93±2,3
Средний объем эритроцита, фл	51,69±0,56	54,37±1,20	51,6±0,6	50,6±0,12**
Общее кол-во тромбоцитов, Г/л	635,9±95,27	717,67±68,41	813,3±50,52	463±112,71**
Тромбокрит, %	0,39±0,06	0,49±0,05	0,54±0,06	0,30±0,08**
Средний объем тромбоцитов, фл	6,05±0,18	6,73±0,12*	6,57±0,32	6,43±0,3
СОЭ, мм/час	0,48±0,1	1±0,29*	2±0,58*	1,17±0,17*

**Примечание:** \* – данные достоверны по сравнению с группой интактных животных ( $p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни); \*\* – данные достоверны по сравнению с 3-ми сутками ( $p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни).

**Таблица 2.** Биохимические показатели крови крыс на разные сроки после затравки  $\text{CCL}_4$  (50 мг/кг) и после введения полиоксидония (0,1 мг/кг)

Показатели	Интактные животные (n=10)	Через 1 сутки (n=3)	Через 3 суток (n=3)	Через 3 суток + полиоксидоний (n=3)
Общий белок, г/л	64,13±7,04	63,2±3,09	71,17±0,5	74,07±2,56
Глюкоза, ммоль/л	6,67±0,38	7,16±0,37	9,08±1,08*	7,36±0,22 **
Креатинин, ммоль/л	0,07±0,01	0,2±0,08*	0,06±0,01	0,03±0,003**
Мочевина, ммоль/л	3,77±0,74	11,73±0,98*	4,2±1,48	3,76±0,08
АСТ, МЕ/л	77,96±27,3	144,1±17,5*	132,6±9,28*	138,83±3,56*
АЛТ, МЕ/л	79,34±15,17	80,1±3,81	97,07±6,63	105,77±22,21
Билир. общий, мкмоль/л	2,77±0,5	3,5±0,49	1,47±0,2	2,03±0,38
Амилаза, МЕ/л	413,39±132,61	3054,1±452,6*	2026±95,27*	2984,9±133,91 *,**
Альбумин, г/л	38,12±0,95	35,20±1,93	38,17±0,82	43,54±0,86 *,**
Щел. фосфатаза, МЕ/л	849,92±89,34	872,97±213,2	741,37±38,58	279,03±28,57 *,**

**Примечание:** \* – данные достоверны по сравнению с группой интактных животных ( $p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни); \*\* – данные достоверны по сравнению с 3-ми сутками ( $p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни).

Острый токсический гепатит развивается уже на 1 сутки после введения  $\text{CCL}_4$ . Морфологическое исследование препаратов печени указывает на диффузную зернисто-вакуольную дистрофию гепатоцитов. Отмечаются очаговые некро-

зы паренхимы и миграция в эту зону полиморфноядерных лейкоцитов. Некрозы локализованы преимущественно под капсулой по периферии органа. В ответ на повреждение обнаруживается реакция со стороны сосудов микроциркулятор-

**Таблица 3.** Гистологические показатели печени крыс на разные сроки после затравки CCL<sub>4</sub> (50 мг/кг) и после введения полиоксидония (0,1 мг/кг)

Показатели	Интактные животные (n=10)	Через 1 сутки (n=3)	Через 3 суток (n=3)	Через 3 суток + полиоксидоний (n=3)
Количество гепатоцитов на 1 мм <sup>2</sup>	2318±71	3787,8±326,43*	1964±88,8 *	1898,1±44,13
Размер гепатоцитов, мкм	22,85±0,39	15,96±0,66*	17,82±0,92*	19,12±0,86*,**
Размер ядра гепатоцитов, мкм	6,28±0,12	6,11±0,26	6,84±0,28	6,81±0,15
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,27±0,006	0,38±0,02*	0,38±0,009*	0,356±0,008*,**
Митотический индекс, %	0,52±0,33	24,82±5,07*	3±0,57 *	3,33±1,45
Количество двуядерных клеток, %	15,4±1,43	124,4±19,9*	52±1,15*	33±10,15 *,**

**Примечание:** \* – данные достоверны по сравнению с группой интактных животных ( $p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни); \*\* – данные достоверны по сравнению с 3-ми сутками ( $p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни).

ного русла в виде полнокровия синусоидальных капилляров, также выражен капилляростаз вен портальных трактов и части центральных вен долек, наблюдается интерстициальный отек. К 3-м суткам патоморфологическая картина печени не меняется.

При морфометрическом исследовании срезов печени уже на первые сутки после затравки животных наблюдается увеличение количества гепатоцитов на единицу площади (1 мм<sup>2</sup>) за счет уменьшения их размеров, хотя на 3 сутки число гепатоцитов снижается. Ядерно-цитоплазматический индекс на 1 и 3 сутки достоверно повышен, при этом размер ядра гепатоцитов остается на том же уровне, что и у интактных животных. При оценке регенераторных процессов печени крыс установлено, что CCL<sub>4</sub> влияет как на внутриклеточную, так и на клеточную регенерацию, о чём свидетельствует достоверное повышение числа митозов и количества двуядерных клеток на все сроки наблюдения (Табл. 3).

После активации иммунной системы у животных с признаками острого токсического гепатита наблюдаются изменения со стороны клеток красной крови и системы свертывания крови. Происходит уменьшение среднего объема эритроцитов, что свидетельствует о гипертоническом характере нарушений водно-электролитного баланса в организме, достоверное снижение количества тромбоцитов и тромбокрита до уровня интактных животных. В то же время показатель СОЭ остается высоким, что указывает на наличие воспалительного процесса в организме (Табл. 1).

Биохимические исследования крови после иммунокоррекции у животных на фоне острого

токсического гепатита выявили, что при неизменном количестве общего белка происходит незначительное увеличение альбумина. О наличии пораженных гепатоцитов можно судить по уровню щелочной фосфатазы. После введения полиоксидония ее уровень достоверно уменьшается, что свидетельствует о деструктивных процессах, продолжающихся в печени. Остаются на достаточном высоком уровне АСТ и АЛТ. Наблюдается значительное повышение амилазы, которое свидетельствует о дальнейшем возможном поражении клеток поджелудочной железы. Хотя, при этом уровень глюкозы снижается до значений интактных животных. Происходит достоверное снижение уровня креатинина, что свидетельствует о проблемах в белковом обмене всего организма (Табл. 2).

Патоморфологическое описание препаратов печени, полученных после изменения функциональной активности иммунной системы при остром токсическом гепатите, свидетельствует, что балочное строение печени сохраняется. Интерстициальный отек остается умеренно выраженным. Под капсулой определяются вакуолизированные гепатоциты с признаками зернистой дистрофии, но в центре долек гепатоциты неизменены. В части портальных трактов перипортально наблюдаются в небольшом количестве лимфоциты. Вены портальных трактов остаются полнокровными.

Морфометрическое исследование срезов печени животных после стимуляции иммунной системы полиоксидонием при токсическом гепатите выявило тенденцию к снижению количества гепатоцитов на единицу площади (1 мм<sup>2</sup>), при этом размер клеток печени достоверно уве-

личивается, а ядерно-цитоплазматический индекс снижается, по сравнению с 3-ми сутками эксперимента, хотя эти показатели не достигают уровня интактных животных. На высоком уровне, по сравнению с контролем, остаются показатели, касающиеся оценки регенераторного процесса, количество митозов и число двуядерных клеток, но наблюдается достоверное снижение количества двуядерных клеток (табл. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Четыреххлористый углерод относится к группе хлорированных углеводов, широко применяющихся в качестве растворителей во многих отраслях производства. Органом, наиболее подверженным воздействию четыреххлористого углерода при его вдыхании или потреблении внутрь в повышенных концентрациях является печень. При этом наблюдаются такие явления, как интенсивное накопление жиров и увеличение печени, а в более тяжелых случаях — повреждение или разрушение гепатоцитов, что может привести к нарушению ее функционирования [4]. Это подтверждается и нашими экспериментальными исследованиями, в которых введение  $CCl_4$  вызывает картину острого токсического гепатита уже на 1 сутки и характеризуется очаговыми некрозами паренхимы печени, локализованными преимущественно под капсулой по периферии органа. Такая локализация повреждений возможна из-за внутрибрюшинного введения гепатотропного яда. Также в ответ на повреждение развивается реакция со стороны микроциркуляторного русла.

В условиях острого токсического гепатита наряду с деструктивными процессами в печени, наблюдаются и репаративные. Печень относится к тканям, для которых характерен как клеточный, так и внутриклеточный типы регенерации. При оценке регенераторных процессов печени экспериментальных крыс установлено достоверное повышение числа митозов, количества клеток на единицу площади препарата, числа двуядерных клеток. При этом преобладают внутриклеточные восстановительные процессы. Полного восстановления структуры ткани печени к 3 суткам не происходит.

Используемый гепатотропный яд оказывает выраженное токсическое действие не только на печень, но и на весь организм в целом. Доказательством этого служит возрастание активности амилазы и уровня глюкозы в крови, а также рост концентрации мочевины и креатинина, что ве-

роятно связано с токсическим действием  $CCl_4$  на поджелудочную железу и почки. Показатель СОЭ указывает на наличие воспалительного процесса в организме на все сроки наблюдения.

Известно, что иммунная система играет важную роль в регуляции восстановительных процессов в разных тканях и органах. Изменяя ее функциональное состояние, например, с помощью иммунокорректоров, возможно целенаправленное влияние на процессы регенерации. В данных экспериментальных исследованиях использовали иммуномодулятор полиоксидоний, который оказывает влияние на все клетки иммунной системы, обладает выраженным детоксицирующим, антиоксидантным, мембраностабилизирующим действием. Кроме того, полиоксидоний влияет на процессы восстановления поврежденной печени, активизируя внутриклеточную форму регенерации и усиливая лимфоцитарную инфильтрацию в органе [5].

При стимуляции иммунной системы полиоксидонием признаки острого токсического гепатита сохраняются, при этом усиливается миграция лимфоцитов в печень. Продолжается активное протекание репаративных процессов за счет клеточной и внутриклеточной регенерации. Биохимический анализ крови свидетельствует о незначительном положительном влиянии препарата на работу поджелудочной железы, но в отношении печени и почек такой тенденции не наблюдается.

Таким образом, стимуляция всех звеньев иммунной системы с помощью препарата полиоксидоний не оказала значимого положительного влияния на репаративную регенерацию печени, что, возможно, связано с недостаточно длительным или с отсроченным по времени с момента отравления введением препарата.

Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (тема № АААА-А18-118020590108-7). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Сенцов В. Г., Данилова И. Г., Медведева С. Ю., Гетте И. Ф., Крохина Н. Б. Влияние макрофагального звена иммунной системы на морфо-функциональное состояние печени на ранних этапах формирования токсического гепатита у крыс. Вестник Уральской медицинской академической науки 2009, 2(25), 300–302. [Sentsov V. G., Danilova I. G., Medvedeva S. Yu., Goethe I. F., Krokhina N. B. Influence of the macrophages of the immune system on the morpho-functional state of the liver in the early stages of the

- formation of toxic the hepatitis in rats. Journal of Ural Medical Academic Science 2009, 2(25), 300–302.]
2. *Медведева С. Ю., Гетте И. Ф., Данилова И. Г., Сенцов В. Г.* Оценка токсического действия полигексаметиленгуанидин гидрохлорида. Токсикологический вестник 2012, 2(113), 52–55. [*Medvedeva S. Yu., Goethe I. F., Danilova I. G., Sentsov V. G.* Evaluation of the toxic effect of polyhexamethyleneguanidine hydrochloride. Toxicological Review 2012, 2(113), 52–55.]
  3. Хаитов Р. М., Пинегин Б. П. Современные иммуномодуляторы: Основные принципы их применения. Иммунология 2000, 5, 4–7. [*Khaitov R. M., Pinegin B. P.* Modern immunomodulators: Basic principles of their application. Immunology 2000, 5, 4–7.]
  4. *Проскурякова И. С.* Морфофункциональные аспекты регенерации печени при экспериментальной коррекции токсического гепатита. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 1995, 6, 656–659. [*Proskuryakova I. S.* Morphofunctional aspects of liver regeneration in experimental correction of toxic hepatitis. Bulletin of experimental biology and medicine 1995, 6, 656–659.]
  5. *Черешнев В. А., Юшков Б. Г., Данилова И. Г., Черешнева М. В., Храмова Ю. С., Чиши М. А., Арташян О. С.* Влияние полиоксидония и тамерита на регенераторные процессы в тканях с различной восстановительной способностью. Иммунология 2005, 4, 198–200. [*Chereshnev V. A., Yushkov B. G., Danilova I. G., Chereshneva M. V., Khramtsova Yu. S., Chishi M. A., Artashjan O. S.* Polyoxidonium and Tamerit influence on the regenerator processes in tissues with different recovery. Immunology 2005, 4, 198–200.]

## THE EFFECT OF THE IMMUNE SYSTEM ON REGENERATIVE PROCESSES OF THE LIVER IN ACUTE TOXIC HEPATITIS

© 2019 N. V. Tyumentseva<sup>1,2\*</sup>, Y. S. Khramtsova<sup>1,3</sup>, O. S. Artashyan<sup>1,3</sup>, R. K. Gafarova<sup>1</sup>

\*E-mail: tumen80@mail.ru

<sup>1</sup>Institute of Immunology and Physiology, UB RAS, Ekaterinburg, Russia;

<sup>2</sup>Institute of medical cell technology, Ekaterinburg, Russia;

<sup>3</sup>Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia

Received: 27.05.2019. Accepted: 30.06.2019

The immune system plays an important role in the regulation of recovery processes in different tissues and organs, including the liver. Changing the functional state of the immune system with Azoximeri bromidum in acute toxic hepatitis does not remove the signs of toxic damage to the liver, while increasing the migration of lymphocytes to this organ. The drug did not have a significant positive effect on the reparative regeneration of the liver, which may be due to the insufficiently long or delayed in time from the moment of poisoning the drug administration.

*Key words:* toxic hepatitis, regeneration, carbon tetrachloride, Azoximeri bromidum

### Authors:

**Tyumentseva N. V.**, ☒ PhD, senior researcher of the laboratory of immunophysiology and immunopharmacology of Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia;

620002 Yekaterinburg, Institute of immunology and physiology, Ural branch of the Russian Academy of Sciences.

Phone: +79226067449, (343)374 00 70. E-mail: tumen80@mail.ru

**Khramtsova Y. S.**, PhD, senior researcher of the laboratory of immunophysiology and immunopharmacology of Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia;

**Artashyan O. S.**, PhD, senior researcher of the laboratory of immunophysiology and immunopharmacology of Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia;

**Gafarova R. K.**, junior researcher of the laboratory of immunophysiology and immunopharmacology of Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia.

## ОСОБЕННОСТИ ИММУНОЙ РЕГУЛЯЦИИ У ВЗРОСЛОГО НАСЕЛЕНИЯ, ПРОЖИВАЮЩЕГО В УСЛОВИЯХ АЭРОГЕННОЙ ЭКСПОЗИЦИИ АЛЮМИНИЕМ

© 2019 г. Ю. А. Челакова, М. А. Гусельников

*E-mail: oleg@fcrisk.ru*

*ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия*

Поступила: 22.05.2019. Принята: 29.06.2019

Выполнено диагностическое обследование 78 человек, постоянно проживающих в зоне негативного влияния выбросов предприятия по производству алюминия. Группу контроля составили 52 человека. Обследование взрослого населения позволило выявить наличие изменений со стороны иммунной системы: прослеживается снижение фагоцитарной активности клеток и дефицит IgG по отношению к норме и контролю; наблюдается достоверное повышение показателей относительного и абсолютного содержания CD4<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Т-лимфоцитов, гиперпродукция антиапоптотического фактора Bcl-2, и снижение значений активационных маркеров CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>. Одновременно с этим выявлен достоверно повышенный по сравнению с возрастной нормой и группой контроля уровень специфической сенсибилизации организма к алюминию по критерию иммуноглобулина класса G. Таким образом, у взрослого населения, проживающего в условиях аэрогенного загрязнения алюминием, установлены изменения клеточной иммунной регуляции, выражающиеся в дисбалансе рецепторного аппарата иммуноцитов и внутриклеточных факторов транскрипции, ассоциированные с повышением специфической сенсибилизации организма к алюминию, что характеризует замедление процессов клеточной гибели и формирование гаптеносредованных пролиферативных реакций.

**Ключевые слова:** иммунорегуляция, сенсибилизация, алюминий

DOI: 10.31857/S102872210007276-8

**Адрес:** 614045, Пермь, ул. Монастырская, 82, ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Долгих Олег Владимирович. Тел.: +7(342)2363930.

**E-mail:** oleg@fcrisk.ru

**Авторы:**

**Челакова Ю. А.**, младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и аллергологии ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия;

**Гусельников М. А.**, младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и аллергологии ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Алюминий относится к иммунотоксичным элементам, он способен кумулироваться и подавлять функцию макрофагов, Т- и В-лимфоцитов [1, 2]. При этом он вызывает не только супрессию клеточных реакций, но и митогенный эффект лимфоцитов [3, 4]. Кроме того, алюми-

ний может вызывать аллергию, что обусловлено супрессивным влиянием этого микроэлемента на мутаген-опосредованный иммунный ответ [5]. В то же время алюминий способствует обострению целого ряда аутоиммунных заболеваний [6].

**Целью** работы является оценка особенностей показателей иммунной регуляции у взрослого населения, проживающего в зоне внешнесредового загрязнения воздуха алюминием.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При углубленном изучении состояния здоровья взрослого населения выполнено иммунологическое диагностическое обследование 78 человек, постоянно проживающих в зоне аэрогенной экспозиции алюминием. Группу контроля составили 52 человека, которые проживают на «условно чистой» территории.

Определение в сыворотке крови иммуноглобулинов классов G, A, M проводили при помо-

щи реакции радиальной иммунодиффузии по Манчини («Микроген», Россия). Метод основан на специфическом связывании антитела с антигеном.

Исследование фагоцитарной активности клеток проводили с использованием в качестве объектов фагоцитоза формализированных эритроцитов барана.

Изменение содержания специфического к поллютанту (алюминию) иммуноглобулина класса G (IgG) определяли в аллергосорбентном тесте с ферментной меткой. Идентифицировали специфические реагены с использованием конъюгированных с пероксидазой антител.

Фенотипирование лимфоцитов проводили на проточном цитометре FACSCalibur фирмы «Becton Dickinson» с использованием универсальной программы CellQuest.PrO. Определение популяций и субпопуляций лимфоцитов (CD25<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>, CD127<sup>-</sup>) проводили методом мембранной иммунофлуоресценции с использованием панели меченых моноклональных антител к мембранным CD-рецепторам («Becton Dickinson», США), при этом регистрировали суммарно не менее 10 000 событий.

Определение уровня экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 проводили с использованием соответствующих МКАТ («Becton Dickinson», США) и одновременным проведением процедуры отрицательного изотипического контроля.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Microsoft® Office Excel 2003 и пакета прикладных программ Statistica 6.0. (StatSoft, США). Данные обрабаты-

вали методом вариационной статистики с расчетом среднего арифметического, его стандартной ошибки. Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента, оценку зависимостей между признаками с помощью корреляционно-регрессионного анализа, критерия Фишера и коэффициента детерминации (R<sup>2</sup>). Качественные данные представлены в виде абсолютных или относительных (%) частот, количественные признаки представлены как M±m (среднее арифметическое ± ошибка среднего). Достоверность отличий между группами считали значимыми при p<0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинико-лабораторные исследования состояния здоровья взрослого населения подтверждают наличие патологических изменений со стороны иммунной системы (Таблица 1). Сравнительный анализ с показателями физиологической нормы и контрольной группы позволил установить, что в группе наблюдения прослеживаются достоверные изменения врожденного клеточного иммунитета — достоверное снижение фагоцитарного числа по отношению к норме и контролю у взрослого населения (74,4% и 75,6% соответственно) (p<0,05). Также, отмечается понижение показателей абсолютного фагоцитоза у 14,1% наблюдаемой группы и процента фагоцитоза у 33,3% наблюдаемой группы относительно группы контроля (p<0,05).

При помощи методического приема оценки отношения шансов были установлены достоверные изменения иммунологических тестов при

**Таблица 1.** Иммунологические показатели взрослого населения в условиях аэрогенного воздействия алюминия

Показатель	Референтный интервал	Группа наблюдения (n=78) M±m	Группа сравнения (n=52) M±m
Процент фагоцитоза, %	35–60	38,321±1,652**	45,905±6,184
Фагоцитарное число, у.е.	0,8–1,2	0,694±0,04*/**	0,981±0,177
Абсолютный фагоцитоз, 10 <sup>9</sup> /дм <sup>3</sup>	0,964–2,988	1,426±0,1**	1,897±0,359
IgG, г/дм <sup>3</sup>	10–18	11,619±0,416**	16,229±1,077
Bcl-2, %	1–1,5	2,813±0,919*/**	1,017±0,427
CD127-лимфоциты, абс., 10 <sup>9</sup> /дм <sup>3</sup>	0,015–0,04	0,082±0,026*/**	0,043±0,026
CD127-лимфоциты, отн., %	0,8–1,2	4,005±0,943*/**	1,704±0,711
CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> -лимфоциты, отн., %	13–24	9,097±2,37*/**	5,143±1,677
CD3 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup> -лимфоциты, абс., 10 <sup>9</sup> /дм <sup>3</sup>	0,63–0,97	0,477±0,094*/**	0,285±0,055
CD3 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup> -лимфоциты, отн., %	39–49	24,71±3,546*/**	13,143±2,33

**Примечание:** \* — разница достоверна относительно референтного интервала (p<0,05); \*\* — разница достоверна относительно группы сравнения (p<0,05).

**Таблица 2.** Особенности специфической сенсибилизации у взрослого населения в условиях аэрогенного воздействия алюминия

Показатель	Физиологическая норма	Группа наблюдения (n=78), M±m	Группа сравнения (n=52), M±m
IgG спец. к алюминию, у.е.	0–0,1	0,196±0,037*/**	0,063±0,032

**Примечание:** \* – разница достоверна относительно референтного интервала ( $p < 0,05$ ); \*\* – разница достоверна относительно группы сравнения ( $p < 0,05$ ).

возрастании концентрации алюминия в биологических средах. Так, наблюдается снижение относительного абсолютного фагоцитоз, фагоцитарного числа и фагоцитарного индекса при увеличении концентрации алюминия в крови ( $R_2=0,15–0,77$  при  $p < 0,05$ ) и моче ( $R_2=0,12–0,28$  при  $p < 0,05$ ).

Установлены разнонаправленные изменения содержания сывороточных иммуноглобулинов классов А, М и G с преимущественным дефицитом иммуноглобулина класса G (IgG) по отношению к группе контроля в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ).

Анализ отношения шансов изменения показателей гуморального иммунитета при возрастании концентрации алюминия в биологических средах позволил установить достоверное ( $p < 0,05$ ) понижение концентрации IgG и IgM при увеличении концентрации алюминия в крови ( $R_2=0,26–0,92$  при  $p < 0,05$ ) и в моче ( $R_2=0,23–0,43$  при  $p < 0,05$ ).

Наблюдаются достоверные отклонения показателей CD-иммунограммы относительно нормы: у 64% и 87% обследуемых выявлено достоверное повышение показателей относительного и абсолютного (соответственно) содержания T-регуляторных лимфоцитов (CD127<sup>-</sup>), отвечающих за супрессию иммунного ответа, и повышение антиапоптотического фактора Bcl-2, одновременно с этим снижены значения активационных маркеров CD95<sup>+</sup> и CD25<sup>+</sup>.

Тем не менее, у группы наблюдения показан достоверный рост антиапоптотического белка Bcl-2, CD127-лимфоцитов, а также активационных клеточных маркеров – рецепторы клеточной смерти CD95<sup>+</sup> и CD25<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ) по отношению к группе контроля – в 2,8, 2,4, 1,9, 1,8 раз соответственно.

Использование методического приема оценки отношения шансов изменения иммунологических тестов при возрастании концентрации алюминия в биологических средах позволило установить достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение CD95<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, Bcl-2, CD127<sup>-</sup> при увеличении концентрации алюминия в моче ( $R_2=0,15–0,49$  при  $p < 0,05$ ).

Одновременно у 65% взрослых выявлен повышенный по сравнению с возрастной нормой уровень специфической сенсибилизации организма к алюминию по критерию иммуноглобулина класса G. Также в 3,1 раза достоверно повышен уровень специфической сенсибилизации к алюминию по критерию IgG по отношению к группе контроля ( $p < 0,05$ ) (Таблица 2).

Анализ отношения шансов изменения показателей гуморального иммунитета при возрастании концентрации алюминия в биологических средах позволил установить достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение общей сенсибилизации (по критерию IgE общего) при увеличении концентрации алюминия в моче ( $R_2=0,06–0,25$  при  $p < 0,05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам клинико-лабораторных исследований состояния здоровья взрослого населения, экспонированного алюминием, выявлены нарушения клеточного звена иммунитета, выражающиеся в изменении фагоцитарной активности клеток, защитных общих иммуноглобулинов, CD-маркеров (CD127<sup>-</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>) и антиапоптотического белка Bcl-2. Так, у взрослого населения, проживающего в условиях аэрогенного загрязнения алюминием, установлены изменения клеточной иммунной регуляции, выражающиеся в дисбалансе рецепторного аппарата иммуноцитов и внутриклеточных факторов транскрипции, ассоциированные с повышением специфической сенсибилизации организма к алюминию, что характеризует замедление процессов клеточной гибели и формирование гаптенопосредованных пролиферативных реакций, что подтверждает наличие патологических изменений со стороны иммунной системы.

## ВЫВОДЫ

Таким образом, у взрослого населения, проживающего в условиях аэрогенной экспозиции алюминием, были выявлены нарушения клеточного звена иммунитета, выражающиеся

в снижении фагоцитарной активности клеток, дефиците защитных общих иммуноглобулинов класса G, активации супрессорных T-клеточных рецепторов CD127<sup>-</sup>, повышении содержания антиапоптотического белка Bcl-2, активационного фактора CD25<sup>+</sup> и рецептора клеточной смерти CD95<sup>+</sup>, на фоне специфической сенсibilизации организма к алюминию.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Долгих О. В., Кривцов А. В., Бубнова О. А. Иммуногенетические показатели у работающих в условиях сочетанного воздействия пыли и производственного шума. Российский иммунологический журнал 2015, 9(18), 2(1), 551–553. [Dolgikh O. V., Krivtsov A. V., Boubnova O. A. Immune and genetic changes in workers exposed to industrial noise and dust. Russian Journal of Immunology 2015, 9(18), 2(1), 551–553].
2. Онищенко Г. Г., Зайцева Н. В., Землянова М. А. Гигиеническая индикация последствий для здоровья при внешнесредовой экспозиции химических факторов. «Книжный формат», Пермь, 2011, 532. [Onishchenko G. G., Zaitseva N. V., Zemlyanova M. A. Identification of health effects caused by environmental chemical exposure. «Knizhnyy format», Perm, 2011, 532].
3. Сынзыныс Б. И., Шарецкий А. Н., Харламова О. В. Иммунотоксичность хлористого алюминия. Гигиена и санитария 2004, 4, 70–72. [Synzynys B. I., Sharetskii A. N., Kharlamova O. V. Immunotoxicity of aluminum chloride. Hygiene and sanitation 2004, 4, 70–72].
4. Golub M. S., Takeuchi P. T., Gershvin M. E., Yoshida S. H. Influence of dietary aluminum on cytokine production by mitogen-stimulated spleen cells from swiss webster mice. Immunofarmacology and Immunotoxicology 1993, 15(5), 605–619.
5. Клиническая иммунология и аллергология / ред. А. В. Караулов. МИА, Москва, 2002, 651. [Clinical immunology and allergology / edited by A. V. Karaulov. MIA, Moscow, 2002, 651].
6. Литовская А. В., Егорова И. В. Состояние иммунной системы работающих в условиях влияния биологического, химического и физического. Медицина труда и промышленная экология 2000, 2, 80–83. [Litovskaya A. V., Egorova I. V. Immune system operating under the influence of biological, chemical and physical factors. Occupational Health and Industrial Ecology 2000, 2, 80–83].

### PECULIARITIES OF IMMUNOREGULATION IN ADULTS LIVING UNDER AEROGENIC EXPOSURE TO ALUMINIUM

© 2019 J. A. Chelakova, M. A. Guselnikov

E-mail: oleg@fcrisk.ru

FBUN Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russia

Received: 22.05.2019. Accepted: 29.06.2019

A diagnostic examination of 78 people living permanently under the negative impact of emissions resulted from enterprise producing aluminum was carried out. The control group consisted of 52 people. Examination of the adult population revealed changes in the immune system: there is a decrease in the phagocytic activity of cells and IgG deficiency in relation to the norm and control; a significant increase in the relative and absolute level of CD4<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T lymphocytes was observed. What is more, we have seen hyperproduction of antiapoptotic factor Bcl-2 and a decrease in the values of activation markers CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>. At the same time, the level of specific sensitization of the organism to aluminum according to the criterion of immunoglobulin of G class was significantly heightened in comparison with the age norm and the control group. Thus, in adults living under arogenic exposure to aluminum, changes in cellular immunoregulation characterized by the imbalance of the receptor apparatus of immunocytes and intracellular transcription factors associated with increased specific sensitization of the body to aluminum, which results in slowing of cell death and the formation of hapten-mediated proliferative reactions, were determined.

*Key words:* immunoregulation, sensitization, aluminum

#### Authors:

**Chelakova J. A.**, Junior researcher of the laboratory of immunology and allergology FBFSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”, Perm, Russia;

**Guselnikov M. A.**, Junior researcher of the laboratory of immunology and allergology FBFSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”, Perm, Russia.

614045 Perm, Monastyrskaya St. 82, FBFSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”, Dolgikh Oleg Vladimirovich. Phone: +7(342)2363930, E-mail: oleg@fcrisk.ru

## ПОСТСТРЕССОРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ПОЛОСТИ МЫШЕЙ

© 2019 г. И. Л. Шаравьева<sup>1\*</sup>, С. В. Гейн<sup>1,2</sup>

\*E-mail: irin.sh@gmail.com

<sup>1</sup>Филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (ПФИЦ УрО РАН), Пермь, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

Поступила: 27.05.2019. Принята: 30.06.2019

Исследовано влияние острого и хронического холодового стресса в условиях блокады опиатных рецепторов на окислительную активность перитонеальных макрофагов мыши. Установлено, что острый холодовой стресс (4°C, 4 часа) независимо от блокады опиатных рецепторов угнетает зимозан-индуцированную окислительную активность перитонеальных макрофагов мыши. Хронический холодовой стресс (4°C, 4 часа, на протяжении 7 суток) на 7-е сут активирует зимозан-индуцированную окислительную активность макрофагов, блокада опиатных рецепторов приводит к отмене данной стимуляции. Увеличение концентрации кортикостерона отмечается как при остром, так и при хроническом переохлаждении и не зависит от блокады опиатных рецепторов.

**Ключевые слова:** холодовой стресс, кортикостерон, макрофаги, хемилюминесценция, опиатные рецепторы, налоксон

DOI: 10.31857/S102872210007278-0

**Адрес:** 614081 Пермь, ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» Уральского отделения Российской академии наук, Шаравьева Ирина Леонидовна.

Тел.: 8(342)2108759. E-mail: irin.sh@gmail.com

**Авторы:**

**Шаравьева И. Л.**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории биохимии развития микроорганизмов «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия;

**Гейн С. В.**, д.м.н., заместитель директора по НИР «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН; профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ПГНИУ, Пермь, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Адаптация организма к изменениям условий окружающей среды обеспечивается комплексом механизмов, среди которых у позвоночных важнейшую роль играет стресс-реакция. Ее главной задачей является поддержание постоянства внутренней среды организма, мобилизация адаптивных механизмов, повышение резистентности к чужеродным агентам. Стресс-реакция носит

универсальный характер, однако, особенности конкретных воздействий окружающей среды приводят к вариативности функционального ответа организма. [1, 2].

Холодовой стресс сопровождается нейро-гуморальными изменениями, характерными для стресса любого генеза. Отмечается повышение уровней адреналина и норадреналина, глюкокортикоидов, катехоламинов, эндогенных опиоидных пептидов [3, 4, 5, 6], воздействие холода приводит к развитию в организме окислительного стресса.

Опиоидная система, которой традиционно отводится стресс-лимитирующая функция, может играть важную роль в адаптации организма к переохлаждению. По-видимому, эффекты холодового воздействия, такие как анальгезия, терморегуляция, модуляция иммунного ответа опосредуются через изменения в функционировании опиоидной системы [7, 8]. В свою очередь, переохлаждение организма приводит к изменению экспрессии генов опиатных рецепторов и концентрации циркулирующих пептидов [9, 5].

Под действием низких температур отмечают изменения в функционировании иммунной системы. В результате действия острого холодового стресса может происходить как усиление, так и ослабление отдельных иммунных функций и показателей, а так же состояние иммунного ответа в целом. Модулируются фагоцитоз, пролиферация, продукция Th1/Th2 (IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ ), про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10) [10, 11]. Ранее нами было показано, что направленность действия острого холодового стресса на функции макрофагов зависела как от исследуемого параметра, так и от времени воздействия, при этом блокада опиатных рецепторов существенно модифицировала иммунорегуляторные эффекты острого переохлаждения [12].

**Цель работы** – исследовать влияние острого и хронического холодового стресса на уровень кортикостерона в плазме крови и продукцию активных форм кислорода перитонеальными макрофагами в условиях блокады опиатных рецепторов у мышей *in vivo*.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили белые мыши самцы массой тела 20–22 г. Животных содержали в условиях лабораторного вивария при естественном освещении, неограниченном доступе к воде и кормам. Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

В работе использовали два варианта холодового стресса – острый и хронический. В первом случае мышей охлаждали при 4°C в течение 4 часов однократно, во втором – по той же схеме ежедневно на протяжении 7 сут. Антагонист опиатных рецепторов налоксона гидрохлорид вводили в дозе 0,2 мг/кг подкожно за 20 мин до охлаждения и повторно через 3 часа от первого введения. Все животные были разбиты на следующие группы: 1-я – контрольная, 2-я – стресс (острое или хроническое переохлаждение), 3-я – стресс на фоне налоксона, 4-я – введение одного налоксона. Мышей выводили из эксперимента непосредственно после охлаждения, в модели хронического стресса на 7-е сутки ежедневного охлаждения. Декапитацию животных осуществляли под эфирным наркозом. Плазму

крови собирали, замораживали и хранили при –20 °С. Клетки перитонеального смыва выделяли по стандартной методике [13].

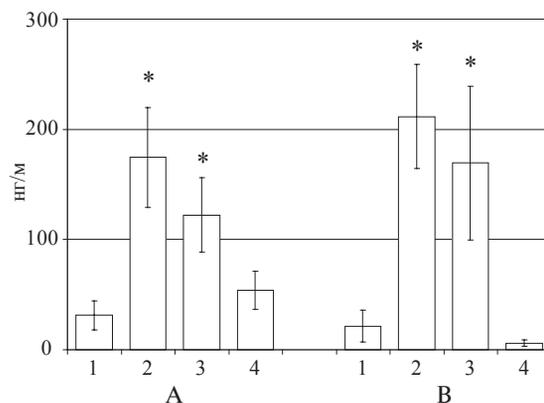
Оценку продукции активных форм кислорода (АФК) перитонеальными макрофагами осуществляли с использованием реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛХЗЛ). Реакцию проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах, каждая лунка содержала 10<sup>5</sup> клеток в 100 мкл раствора Хенкса. В качестве индуктора ЛХЗЛ использовали опсонизированный зимозан в концентрации 150 мкг/мл. В качестве маркера выраженности реакции ЛХЗЛ использовался люминол 10<sup>-5</sup> М (Sigma). Регистрация результатов проводилась в течение часа с интервалом в 5 мин с помощью многофункционального спектрофотометра TECAN (Австрия).

Концентрацию кортикостерона в плазме крови определяли иммуноферментным методом с использованием тест-систем Enzo (США).

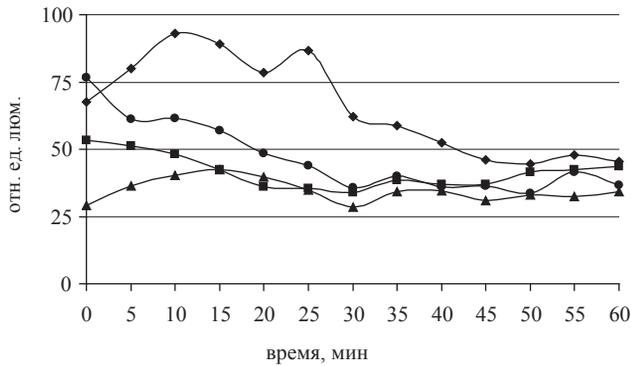
Статистическая обработка результатов проведена с использованием непарного t-критерия Стьюдента. Все данные на рисунках представлены в виде средней и её стандартной ошибки (M $\pm$ m).

### РЕЗУЛЬТАТЫ

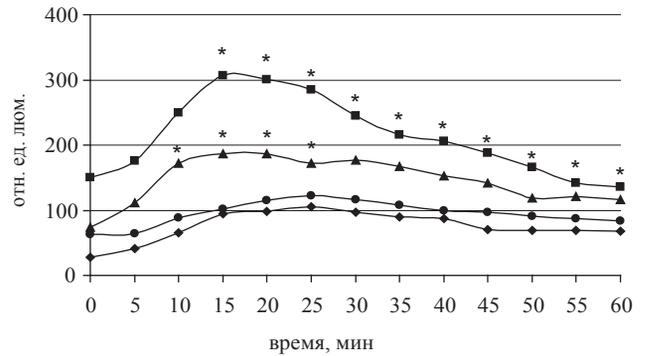
Установлено, что под действием как острого, так и хронического переохлаждения отмечалось значительное увеличение концентрации кортикостерона в плазме крови экспериментальных животных, предварительное введение мышам налоксона на уровень кортикостерона в периферической крови статистически значимого влияния не оказывало (Рис. 1).



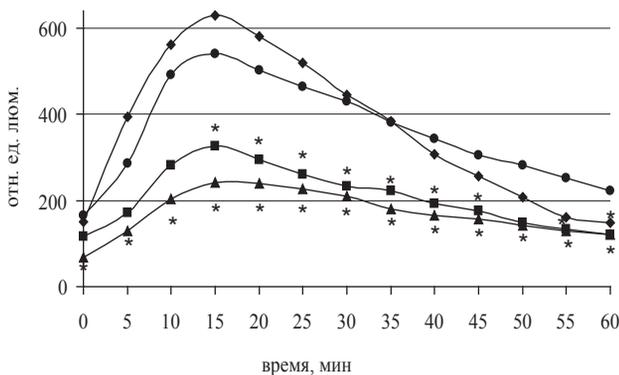
**Рис. 1.** Влияние хронического (А) и острого (Б) холодового стресса на уровень кортикостерона в крови мышей в условиях блокады опиатных рецепторов. Группы животных: 1 – контроль, 2 – стресс, 3 – стресс+налоксон, 4 –налоксон (n=11).



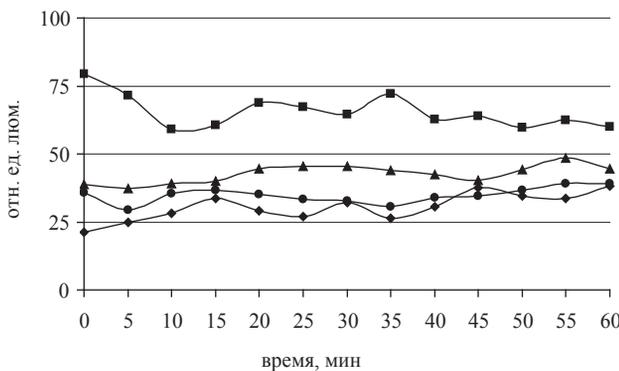
**Рис. 2.** Влияние острого холодового стресса (4°C, 4 часа) на спонтанную продукцию АФК перитонеальными макрофагами мыши в условиях блокады опиатных рецепторов. • - контроль; ■ - стресс; ▲ - стресс+наллоксон; ▾ - наллоксон. \* –  $p < 0,05$  к контролю, ( $n=9$ ).



**Рис. 5.** Влияние хронического холодового стресса на зимозан-стимулированную продукцию АФК перитонеальными макрофагами мыши в условиях блокады опиатных рецепторов. • - контроль; ■ - стресс; ▲ - стресс+наллоксон; ▾ - наллоксон. \* –  $p < 0,05$  к контролю, ( $n=9$ ).



**Рис. 3.** Влияние острого холодового стресса (4°C, 4 часа) на зимозан-стимулированную продукцию АФК перитонеальными макрофагами мыши в условиях блокады опиатных рецепторов. • - контроль; ■ - стресс; ▲ - стресс+наллоксон; ▾ - наллоксон. \* –  $p < 0,05$  к контролю, ( $n=9$ ).



**Рис. 4.** Влияние хронического холодового стресса на спонтанную продукцию АФК перитонеальными макрофагами мыши в условиях блокады опиатных рецепторов. • - контроль; ■ - стресс; ▲ - стресс+наллоксон; ▾ - наллоксон. \* –  $p < 0,05$  к контролю, ( $n=9$ ).

Установлено, что острый холодовой стресс, а также стресс на фоне блокады опиатных рецепторов не влияет на продукцию активных форм кислорода в спонтанных культурах перитонеальных клеток. В стимулированных зимозаном культурах острое переохлаждение оказывало угнетающее воздействие на динамику кислородного взрыва на всем протяжении наблюдения. На фоне блокады опиатных рецепторов наблюдалось значимое угнетение продукции АФК перитонеальными макрофагами мыши с 20 мин наблюдения.

Хронический холодовой стресс не оказывал влияния на спонтанную продукцию АФК перитонеальными макрофагами мыши (Рис. 2). В стимулированных зимозаном культурах под действием хронического холодового стресса происходит усиление продукции АФК с 15 по 60 минуту исследования. В 3-й группе животных, при воздействии хронического холода на фоне блокады опиатных рецепторов отмечается усиление кислородзависимой микробицидности с 10 по 25 минуту исследования (Рис. 3, 4, 5). Таким образом, блокада опиатных рецепторов приводила к частичной отмене эффектов холодового стресса на продукцию АФК макрофагами.

Таким образом, можно отметить модулирующее действие холодового стресса на функции перитонеальных макрофагов, которое в зависимости от продолжительности воздействия может иметь стимулирующую или угнетающую направленность. Эндогенная опиоидная система принимает важное участие в регуляции функций макрофагов при переохлаждении.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Холодовой стресс модулирует функции иммунной системы: под его влиянием отмечено увеличение тимуса, активация клеточно-опосредованного иммунитета, повышение метаболической активности макрофагов, снижение фагоцитоза, усиление продукции АФК и оксида азота [3, 13, 14, 15, 16]. Ранее нами было показано, что короткий холоддовой стресс при  $-20^{\circ}\text{C}$  модулировал окислительную активность перитонеальных макрофагов в зависимости от времени экспозиции. Холодовой стресс при  $-20^{\circ}\text{C}$  на протяжении 10 минут приводил к угнетению выраженности реакции ЛЗХЛ, тогда как такое же охлаждение на протяжении 60 минут приводило к стимуляции выраженности реакции ЛЗХЛ [11]. В данном исследовании острый холоддовой стресс при  $4^{\circ}\text{C}$  на протяжении 4 часов приводил к независимому от налоксона угнетению кислородного взрыва в зимозан-стимулированных культурах. Хронический же 4 часовой стресс, напротив, усиливал данную реакцию.

Различия в направленности действия моделей холоддового стресса могут быть связаны в первую очередь с динамикой гормонального сдвига при стрессе, в том числе с активацией эндогенной опиоидной системы. Однако, возможно, при различных режимах охлаждения изменяется динамическая активность периферических термочувствительных афферентов, что приводит к изменению иммунных показателей [17].

Работа выполнена в рамках государственного задания номер госрегистрации темы: 01201353248.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. McEwen B. C., Wingfield J. C. What's in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress 2011, 57, 2, 1–16.
2. Поликарпов И. А., Кондратюк Е. Ю., Петровский Д. В., Новиков Е. А. Межпопуляционная изменчивость эндокринно-метаболической реакции на холоддовой стресс у красной полевки (*Myodes rutilus*). Журнал общей биологии 2016, 77, 4, 284–292. [Polikarpov I. A., Kondratyuk E. Yu., Petrovsky D. V., Novikov E. A. Interpopulation variability of endocrine-metabolic reaction to cold stress in northern red-backed vole (*Myodes rutilus*). Biology Bulletin Reviews 2016, 77, 4, 284–292.]
3. Sesti-Costa R., Baccan G. C., Chedraoui-Silva S., Mantovani B. Effects of acute cold stress on phagocytosis of apoptotic cells: the role of corticosterone Neuroimmunomodulation 2010, 17(2), 79–87.
4. Sugama S., Takenouchi T., Fujita M., Kitanib H., Hashimoto M. Cold stress induced morphological microglial activation and increased IL-1 $\beta$  expression in astroglial cells in rat brain. Journal of Neuroimmunology 2011, 233(1–2), 29–36.
5. Pancheri P., Zichella L., Fraioli F., Carilli L., Perrone G., Biondi M., Fabbri A., Santoro A., Moretti C. ACTH, beta-endorphin and met-enkephalin: peripheral modifications during the stress of human labor. Psychoneuroendocrinology 1985, 10(3), 289–301.
6. Suckow M. A., Terril L. A., Grigdesby C. F., March P. A. Evaluation of Hypothermia-Induced Analgesia and Influence of Opioid Antagonists in Leopard Frogs (*Rana pipiens*). Pharmacology Biochemistry and Behavior 1999, 63(1), 39–43.
7. Salmi P., Kela J., Arvidsson U., Wahlestedt C. Functional interactions between  $\delta$ - and  $\mu$ -opioid receptors in rat thermoregulation. European Journal of Pharmacology 2003, 458(1–2), 101–106.
8. Cadet P., Zhu W., Mantione K. J., Baggerman G., Stefan G. B. Cold stress alters *Mytilus edulis* pedal ganglia expression of mu opiate receptor transcripts determined by real-time RT-PCR and morphine levels. Brain Res Mol Brain Res 2002, 99(1), 26–33.
9. Sesti-Costa R., Ignacchiti M. D., Chedraoui-Silva S., Marchi L. F., Mantovani B. Chronic cold stress in mice induces a regulatory phenotype in macrophages: correlation with increased 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase expression. Brain Behav Immun 2012, 26(1), 50–60.
10. Zhu G. F., Chancellor-Freeland C., Berman A. S., Kage R., Leeman S. E., Beller D. I., Black P. H. Endogenous substance P mediates cold water stress-induced increase in interleukin-6 secretion from peritoneal macrophages. J. Neurosci 1996, 16(11), 3745–3752.
11. Гейн С. В., Шаравьева И. Л. Влияние холоддового стресса на функциональную активность перитонеальных макрофагов мыши в условиях блокады опистных рецепторов. Российский физиологический журнал им. Сеченова 2016, 102, 188–194. [Gein S. V., Sharav'eva I. L. Effects of Cold Stress on the Functional Activity of Mouse Peritoneal Macrophages in Conditions of Opiate Receptor Blockade. Neuroscience and Behavioral Physiology 2017, 47, 5, 524–527.]
12. Иммунологические методы. Под ред. Г. Фримеля, М., 1987, 472. [Immunological methods / Ed. H. Fritemel, M., 1987, 472 p.]
13. Беседин И. М., Бажин А. С., Мельников В. П., Калёнова Л. Ф. Моделирующий эффект температурных воздействий слабой интенсивности на психонервно-иммуноэндокринную систему теплокровного организма. Вестник Тюменского государственного университета. Экология и природопользование 2016, 2,2, 144–159. [Besedin I. M., Bazhin A. S., Melnikov V. P., Kalenova L. F. Simulating effect of low intensity temperature actions on psycho-neuro-immuno-endocrine system of warm-blooded organisms. Tyumen State University Herald. Natural Resource Use and Ecology 2016, (2), 144–159.]
14. Гейн С. В., Шаравьева И. Л. Иммуномодулирующие эффекты холоддового стресса. Успехи современной биологии 2018, 138, 3, 243–250. [Gein S. V., Sharav'eva I. L. Immunomodulating Effects of Cold Stress. Biology bulletin reviews 2018, 6, 482–488.]

15. Salman H., Bergman M., Bessler H., Alexandrova S., Beilin B., Djaldetti M. Hypothermia affects the phagocytic activity of rat peritoneal macrophages. *Acta Physiol Scand* 2000, 68(3), 431–16.
16. Sandhu M. A., Zaib A., Anjum M. S., Qayyum M. Empirical evidence of cold stress induced cell mediated and humoral immune response in common myna (*Sturnus tristis*). *Int J Biometeorol* 2015, 59(11), 1607–13.
17. Козырева Т. В., Елусеева Л. С. Иммуный ответ и содержание кортикостероидов при различных режимах охлаждения. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2002, 4, 384–387. [Kozyreva T. V., Eliseeva L. S. The immune response and the content of corticosteroids with different modes of cooling. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2002, 4, 384–387.]

## POSTSTRESSOR CHANGES IN FUNCTIONAL ACTIVITY OF CELLS OF PERITONEAL CAVITY OF MICE

© 2019 I. L. Sharav'eva<sup>1\*</sup>, S. V. Gein<sup>1,2</sup>

*E-mail: irin.sh@gmail.com*

<sup>1</sup>*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UrB RAS, Perm, Russia;*

<sup>2</sup>*Perm State University, Perm, Russia*

**Received:** 27.05.2019. **Accepted:** 30.06.2019

The effect of acute and chronic cold stress in the conditions of the blockade of opiate receptors on the oxidative activity of mouse peritoneal macrophages was studied. It was established that acute cold stress (4°C, 4 hours), regardless of the blockade of opiate receptors, inhibits zymosan-induced oxidative activity of mouse peritoneal macrophages. Chronic cold stress (4°C, 4 hours, for 7 days) on the 7<sup>th</sup> day activates zymosan-induced oxidative activity of macrophages, blockade of opiate receptors leads to the cancellation of this stimulation. An increase in the concentration of corticosterone is observed both in acute and in chronic hypothermia and does not depend on the blockade of opiate receptors.

*Key words:* cold stress, corticosterone, macrophages, chemiluminescence, opiate receptors, naloxone

### Authors:

**Sharav'eva I. L.**, ✉ PhD Biological Sciences, scientific researcher of the laboratory of biochemistry of microorganism development of the Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia; Perm, Institute of ecology and genetics of microorganisms, Ural branch of the Russian Academy of Sciences. Phone: +79127818125, **E-mail:** irin.sh@gmail.com

**Gein S. V.**, MD, Professor, deputy director for research at the Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, professor of the Department of microbiology and immunology of the Biology Faculty of the Perm State University, Perm, Russia.

## АНТИМИКРОБНЫЙ ЭФФЕКТ НЕКОТОРЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПЛАТИНЫ И ОДНОГО ИЗ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИДИНИЯ В ОТНОШЕНИИ *ESCHERICHIA COLI*

© 2019 г. Н. М. Шлепотина<sup>1\*</sup>, О. Л. Колесников<sup>1</sup>, Ю. С. Шишкова<sup>1</sup>,  
И. В. Галагудин<sup>1</sup>, Е. В. Калита<sup>2</sup>, А. Р. Ткачёва<sup>2</sup>, Д. Г. Ким<sup>2</sup>

\*E-mail: grant0408@yandex.ru

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)», Челябинск, Россия

Поступила: 22.05.2019. Принята: 25.06.2019

В настоящее время формирующаяся у микроорганизмов устойчивость к антибактериальным веществам открывает новые области поиска альтернативных соединений с подобными свойствами. В последние годы активно изучаются антимикробные свойства соединений платины и производных пиридиния. Целью настоящего исследования было изучить антибактериальный эффект водных растворов бромида 1-аллил-2-аминопиридиния и двух гексахлороплатинатных комплексов в отношении *Escherichia coli* в трех опытах. В результате проведенных исследований выявлен достоверный антибактериальный эффект одного из соединений платины по отношению к *Escherichia coli*.

**Ключевые слова:** антимикробные агенты, кишечная палочка, соединения платины, производные пиридиния

DOI: 10.31857/S102872210007279-1

**Адрес:** Челябинск, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Шлепотина Нина Михайловна. Тел.: +7 (351) 262-78-23.

**E-mail:** grant0408@yandex.ru

**Авторы:**

**Шлепотина Н. М.**, преподаватель кафедры биологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

**Колесников О. Л.**, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

**Шишкова Ю. С.**, д.м.н., доцент, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

**Галагудин И. В.**, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

**Калита Е. В.**, инженер, лаборант-исследователь кафедры теоретической и прикладной химии ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия;

**Ткачёва А. Р.**, аспирант кафедры теоретической и прикладной химии ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия;

**Ким Д. Г.**, д.х.н., профессор, профессор кафедры теоретической и прикладной химии ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Наряду с механизмами естественной иммунной защиты, в борьбе с инфекционными агентами значимую роль играет использование антимикробных соединений, обладающих бактериостатическим либо бактерицидным действием [1, 2, 3]. В настоящее время продолжают изучаться различные аспекты устойчивости к антисептикам, дезинфицирующим средствам и антибиотикам, механизмы которой базируются, в первую очередь, на уменьшении проницаемости клеточной стенки, а также на способности к активному выведению вещества из микробной клетки. Генетические детерминанты, обуслов-

ливающие реализацию данных способов уклонения, продолжают исследоваться [4]. Снижение чувствительности к антисептикам может быть связано с формированием биопленок, что оказалось справедливым, например, для хлоргексидина в отношении возбудителей нозокомиальных инфекций и цетилпиридиния хлорида в отношении возбудителей инфекций верхних дыхательных путей. На этих же антисептиках коллективом авторов была показана возможность образования резистентных клонов в условиях давления субингибирующих концентраций антимикробных веществ, особенно характерная для изолятов синегнойной палочки, золотистого стафилококка и клебсиеллы пневмонии [5]. Применение антимикробных препаратов должно базироваться на данных микробиологического мониторинга с определением особенностей микробного пейзажа, отличающегося у пациентов различного профиля [6]. Так, например, у пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы лидирующим возбудителем является золотистый стафилококк [7, 8], инфекционным осложнением у пациентов с опухолями системы крови присуще наличие пестротой микробиологической картины, с возможным участием как грамположительных, так и грамотрицательных возбудителей [9, 10]. Таким образом, наличие специфичной для разных типов инфекционной патологии флоры диктует необходимость поиска новых антимикробных препаратов с широким спектром действия и возможностью их универсального применения.

Комплексные соединения платины проявляют как противоопухолевые, так и антимикробные свойства. Механизмы подобных эффектов до сих пор изучаются. Одним из таких механизмов, например, у цисплатина является связывание с пуриновыми основаниями, которое приводит как к образованию сшивок между двумя цепями ДНК, так и к фиксации одной цепи [11]. Известны данные об антимикробном действии новых биядерных комплексов платины (II) с тетразолом и 5-метилтетразолом, сопоставимом с цисплатиной, для грамотрицательных бактерий, и выше, чем у цисплатины, для грамположительных бактерий [12]. В данном исследовании авторы использовали концентрации вещества 0,02; 0,01; 0,005 и 0,0025 моль/л. По данным зарубежных авторов, комплексы платины (IV) с S-алкильными производными тиосалициловой кислоты состава  $[PtCl_2(S-R-thiosal)_2]$  проявили в эксперименте антибактериальные

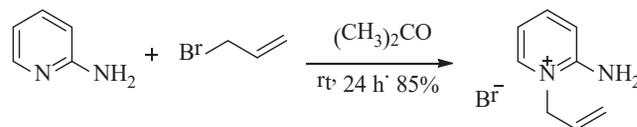
и антибиопленочные свойства. Минимальные ингибирующие концентрации варьировали от уровня менее 7,81 мкг/мл до 250 мкг/мл – наибольшее значение оказалось справедливым и для *Escherichia coli* ATCC25922 [13]. У хлорида N-нафтилендиаминплатины (II) была зафиксирована способность ингибировать рост бактерий синегнойной палочки в концентрации 15 мг/мл [14].

Антимикробной активностью обладают и производные пиридиния. Так, например, в опыте Abdel-Aziz et al. (2005) для ряда 2-аминопиридинов были определены минимальные ингибирующие концентрации: против *S. aureus* – 11,7 мкг/мл, против *E. coli* – 4,1; 3,2 мкг/мл [15, 17]. 2-(6-Нитробензо[d]тиазол-2-иламино)никотиновая кислота и ее гидразид показали минимальную ингибирующую концентрацию, равную 100 мкг/мл, в отношении кишечной палочки, а также выраженный антимикробный эффект для *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* и *P. aeruginosa* [16, 17].

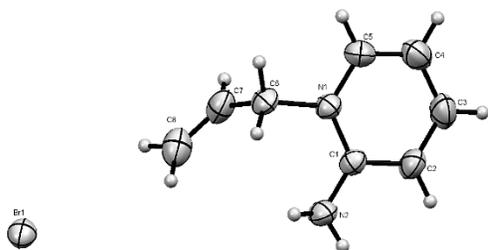
**Целью** данного исследования было установление антимикробного эффекта для водных растворов бромида 1-аллил-2-аминопиридиния и двух гексахлороплатинатных комплексов с использованием в качестве тест-культуры *E. coli* штамма M-17.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

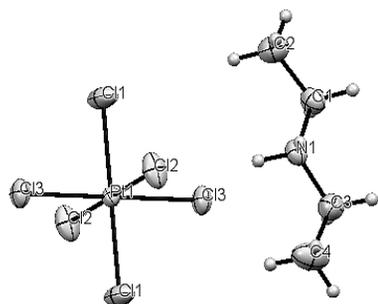
Бромид 1-аллил-2-аминопиридиния (вещество 1) получен взаимодействием 2-аминопиридина с аллилбромидом в ацетоне в отсутствие основания при комнатной температуре с выходом 85% [18, 19] и представляет собой бесцветный кристаллический продукт, растворимый в воде, с известной структурой (Рис. 1, 2). Полные таблицы координат атомов, длин связей и валентных углов депонированы в Кембриджском банке структурных данных под номером CCDC1053362. Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Российской Федерации (постановление № 211 от 16.03.2013), соглашение № 02.А03.21.0011) и в рамках государственного задания Министерства образования и науки России (№ 4.9665.2017/8.9).



**Рисунок 1.** Структура бромида 1-аллил-2-аминопиридиния подтверждена методом рентгеноструктурного анализа



**Рисунок 2.** Молекулярная структура бромиды 1-аллил-2-аминопиридина в представлении атомов эллипсоидов тепловых колебаний с 50% вероятности по данным рентгеноструктурного анализа.



**Рисунок 3.** Молекулярная структура гексахлороплатината диэтиламмония в представлении атомов эллипсоидов тепловых колебаний с 50% вероятности по данным рентгеноструктурного анализа.

Гексахлороплатинатные комплексы получены взаимодействием гексахлороплатиноводородной кислоты с хлоридами диэтиламмония и трис(оксиметил)метиламмония в ацетонитриле. Вещество 2 ( $[(C_2H_5)_2NH_2]_2[PtCl_6]$ ) и вещество 3 ( $[NH_3C(CH_2OH)_3]_2[PtCl_6]$ ) представляют собой оранжевые кристаллы, выход которых составил 66% и 74% соответственно. Полученные комплексы состоят из тетраэдрических катионов органиаммония и гексахлороплатинатных октаэдрических анионов:  $2[R_2NH_2]Cl + H_2[PtCl_6] \rightarrow [R_2NH_2]_2[PtCl_6] + 2HCl$ , где  $R = C_2H_5, C(CH_2OH)_3$ .

Методом рентгеноструктурного анализа установлено строение гексахлороплатината диэтиламмония (Рис. 3).

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Российской Федерации (постановление № 211 от 16.03.2013, соглашение № 02.A03.21.0011) и в рамках государственного задания Министерства образования и науки России (№ 4.6151.2017/8.9).

Для выявления антибактериального эффекта использовали растворы веществ 1, 2, 3 в следующих рабочих концентрациях:  $C_8H_{11}BrN_2 - 0,0625$  г/мл;  $[(C_2H_5)_2NH_2]_2[PtCl_6] - 0,0045$  моль/л;  $[NH_3C(CH_2OH)_3]_2[PtCl_6] - 0,003$  моль/л. В качестве тест-культуры была выбрана суточная взвесь *E. coli* штамм М-17 из препарата «Колибактерин» в концентрации  $10^8$  КОЕ/мл. Для определения антимикробной активности тестируемых веществ в каждую пробирку с 0,9 мл раствора вещества вносили 0,1 мл взвеси бактерий, после чего пробирки инкубировали в течение 30 минут при 37 °С. Затем содержимое пробирок калиброванной бактериальной петлей (0,001 мл) высевали на пластинчатую среду Эндо. Чашки инкубировали при 37 °С в течение 24 часов, а после проводили качественный учет по наличию или отсутствию бактериального роста. На контрольную чашку производили посев 0,001 мл из пробирки, содержащей 0,1 мл взвеси *E. coli* в 0,9 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Опыт был проведен трехкратно с последующим статистическим учетом данных при помощи точного критерия Фишера (двустороннего) с использованием калькулятора для расчета статистических критериев (Интернет-ресурс): <https://medstatistic.ru/calculators.html>.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе проведения серии экспериментов были получены следующие результаты: во всех контрольных чашках наблюдался рост колоний ( $n=5$ ), в опытах с веществом 1 бактериальный рост имел место в 2 чашках из 3, в исследованиях

**Таблица 1.** Оценка достоверности полученных результатов

	Число единиц наблюдения (n)	Наличие роста (n)	Отсутствие роста (n)	p
Контроль	5	5	0	-
$C_8H_{11}BrN_2$	3	2	1	0,37500
$[(C_2H_5)_2NH_2]_2[PtCl_6]$	3	0	3	0,01786
$[NH_3C(CH_2OH)_3]_2[PtCl_6]$	3	1	2	0,10714

с веществом 2 рост отсутствовал во всех 3 чашках, при тестировании вещества 3 рост был отмечен в 1 чашке из 3. Оценка значимости различий исходов была выполнена с помощью двустороннего точного критерия Фишера (Таблица 1).

Таким образом, наличие антимикробного эффекта в отношении штамма М-17 *E. coli* было достоверно установлено для тестируемого вещества 2 ( $[(C_2H_5)_2NH_2]_2[PtCl_6]$ ), в то время как для остальных веществ разница в бактериальном росте оказалась недостоверной.

### ОБСУЖДЕНИЕ

С учетом имеющихся литературных данных, в исследовании были использованы концентрации водных растворов комплексов платины и производного пиридиния, приближенные к минимальным ингибирующим концентрациям подобных веществ, выявленным в исследованиях других авторов, обозначенных выше [10, 15, 16]. Обнаружение достоверного антимикробного эффекта в отношении штамма М-17 *E. coli* для вещества  $[(C_2H_5)_2NH_2]_2[PtCl_6]$  и недостоверных результатов с веществами  $C_8H_{11}BrN_2$  и  $[NH_3C(CH_2OH)_3]_2[PtCl_6]$  требует расширения исследования с применением штаммов клинически значимых микроорганизмов, а также увеличением количества рассматриваемых разведений препаратов с целью установления минимальной ингибирующей концентрации каждого и повышения достоверности результатов.

### ВЫВОДЫ

Для вещества  $[(C_2H_5)_2NH_2]_2[PtCl_6]$  в концентрации 0,0045 моль/л было установлено наличие антибактериального эффекта в опытах с штаммом М-17 *Escherichia coli*.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность профессору В. В. Шарутину и профессору О. К. Шарутиной за проведенные рентгеноструктурные исследования и консультации.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Долгушин И. И., Андреева Ю. С., Мезенцева Е. А., Савочкина А. Ю., Плеханова Е. В., Свиридов М. А., Пешикова М. В. Нейтрофилы регулируют формирование микробиоценоза слизистых оболочек. Медицинская иммунология. 2006, (2–3), 8, 135–136. [Dolgushin I. I., Andreeva Yu. S., Mezentseva Ye. A., Savochkina A. Yu., Plekhanova Ye. V., Sviridov M. A., Peshikova M. V. Neutrophils regulate the formation of
2. Меджитов Р., Джаневей Ч. Врожденный иммунитет. Казанский медицинский журнал. 2004, (3), 161–167. [Medzhitov R., Dzhanavey Ch. Congenital immunity. Kazan Medical Journal. 2004, (3), 161–167.]
3. Шабанов П. Д. Антисептики нового поколения. Фармакология катапола и родственных соединений. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2002, (2), 64–72. [Shabanov P. D. Antiseptics new generation. Pharmacology of catapol and related compounds. Reviews of clinical pharmacology and drug therapy. 2002, (2), 64–72.]
4. Гренкова Т. А., Селькова Е. П., Гусарова М. П., Ершова О. Н., Александрова И. А., Сазыкина С. Ю., Курдюмова Н. В. Контроль за устойчивостью микроорганизмов к антибиотикам, антисептикам и дезинфицирующим средствам. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014, 1 (74), 29–33. [Grenkova T. A., Selkova E. P., Gusarova M. P., Ershova O. N., Alexandrova I. A., Sazykina S. Yu., Kurdyumova N. V. Control of the resistance of microorganisms to antibiotics, antiseptics and disinfectants. Epidemiology and vaccine prevention. 2014, 1 (74), 29–33.]
5. Дятлов И. А., Детушева Е. В., Мицевич И. П., Детушев К. В., Подкопаев Я. В., Фурсова Н. К. Чувствительность и формирование устойчивости к антисептикам и дезинфектантам у возбудителей внутрибольничных инфекций. Бактериология. 2017, (2), 2, 48–58. [Dyatlov I. A., Detusheva E. V., Mitsевич I. P., Detushev K. V., Podkopaev Ya. V., Fursova N. K. Sensitivity and resistance to antiseptics and disinfectants in pathogens of nosocomial infections. Bacteriology. 2017, (2), 2, 48–58.]
6. Божкова С. А., Афиногенов Г. Е., Разоренов В. Л., Петрова Т. М. Мониторинг микробного пейзажа в отделении гнойной хирургии – основа для разработки рациональной антибактериальной терапии. Клинико-лабораторный консилиум. 2009, (3 (28)), 50–56. [Bojkova S. A., Afinogenov G. E., Razoryonov V. L., Petrova T. M. Microbial picture monitoring in department of purulent surgery as a base of rational antibacterial therapy. Clinical laboratory consilium. 2009, (3 (28)), 50–56.]
7. Федосеев А. В., Сифоров Р. В., Инютин А. С., Чекушин А. А., Кроливец Д. В. Особенности микробного пейзажа раневой поверхности у больных с синдромом диабетической стопы. Антибиотики и химиотерапия. 2016, (5–6), 21–24. [Fedoseev A. V., Siforov R. V., Inyutin A. S., Chekushin A. A., Krolivets D. V. Features of the microbial landscape of the wound surface in patients with diabetic foot syndrome. Antibiotics and chemotherapy. 2016, (5–6), 21–24.]
8. Шлепотина Н. М., Колесников О. Л., Плоткин Л. Л. Микробный пейзаж у пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы. Российский иммунологический журнал. 2015, 9(18), (2–1). 710–712. [Shlepotina N. M., Kolesnikov O. L., Plotkin L. L. Microbial landscape in patients with purulent-necrotic forms of diabetic foot syndrome. Russian immunological journal. 2015, 9 (18), (2–1). 710–712.]

9. Рябухина Ю. Е., Демина Е. А., Ларионова В. Б. Проблема инфекционных осложнений у больных лимфомой Ходжкина с неблагоприятным прогнозом. Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. 2008, (2), 50–62. [Ryabukhina Yu. E., Demina E. A., Lariionova V. B. The problem of infectious complications in patients with Hodgkin's lymphoma with a poor prognosis. Bulletin ROCS them. N. N. Blokhin RAMS. 2008, (2), 50–62.]
10. Peshikova M. V., Dolgushin I. I., Rusanova N. N. Etiology and structure of infectious complications of cytostatic therapy in children with acute lymphoblastic leukemia and non-B-cell non-Hodgkin lymphomas // Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2002. (1). 70–71.
11. Вартанян А. А., Огородникова М. В. Молекулярные механизмы действия препаратов платины. Российский биотерапевтический журнал. 2004, (1), 14–19. [Vartanyan A. A., Ogorodnikova M. V. Molecular mechanisms of action of platinum drugs. Russian Biotherapeutic Journal. 2004, (1), 14–19.]
12. Склянкина А. А., Караваева А. В., Яковлев К. И. Изучение антимикробной активности бинадерных комплексов платины (II) с тетразолами. Инновации в здоровье нации: сборник материалов III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Санкт-Петербург, 2015, 413–416. [Sklyankina A. A., Karavaeva A. V., Yakovlev K. I. Study of the antimicrobial activity of binuclear platinum complexes (II) with tetrazolines. Innovations in the health of the nation: a collection of materials of the III All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation. St. Petersburg, 2015, 413–416.]
13. Mijajlovic M. Z., Vasic S. M., Radojevic I. D., Maksimovic J. Antibacterial and antibiofilm screening of new platinum (IV) complexes with some s-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Kragujevac J. Sci. Materials of conference: 2nd International Electronic Conference on Medicinal Chemistry. Kragujevac, 2016, 39, (2017), 137–143.
14. Chehregani A. H., Sabounchi S. J., Jodaian V. Antibacterial effect of N-naphtylen diamine platinum (II) chlorohydrate as novel compound. Pak. J. Biol. Sci. 2007, (4), 10, 641–644.
15. Abdel-Aziz A. A. M., El-Subbagh H. I., Kunieda T. Lewis acid-promoted transformation of 2-alkoxy-pyridines into 2-aminopyridines and their antibacterial activity. Part 2: Remarkably facile C-N bond formation. Bioorg. Med. Chem. 2005, (13), 4929–4935.
16. Patel N. B., Shaikh F. M. Synthesis of new pyridine based 4-thiazolidinones incorporated benzothiazoles and evaluation of their antimicrobial activity. J. Sci. Islam. Rep. Iran. 2010, 21 (2), 121–129.
17. Marinescu M. 2-Aminopyridine – a classic and trendy pharmacophore. Int. J. Pharm. Bio. Sci. 2017, 8, (2), 338–355.
18. Ким Д. Г., Бердникова Е. В., Слепухин П. А. Алкилирование 2-аминопиридина аллилбромидом и металлилхлоридом. Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Химия 2014, (4), 6, 5–13. [Kim D. G., Berdnikova E. V., Slepukhin P. A. Alkylation of 2-aminopyridine with allylbromide and metallylchloride. Bulletin of the South Ural State University. Series: Chemistry 2014, (4), 6, 5–13.]
19. Ким Д. Г., Успенская С. Е. Взаимодействие гидрогалогенидов 1-аллил-2-имино-1,2-дигидропиридина с галогенами. Известия вузов. Химия и химическая технология. 1993, 9, 121–123. [Kim D. G., Uspenskaya S. E. Interaction of 1-allyl-2-imino-1,2-dihydropyridine hydrohalides with halogens. News of universities. Chemistry and chemical technology. 1993, 9, 121–123.]

## ANTIMICROBIAL EFFECT OF SOME COMPOUNDS OF PLATINUM AND ONE OF PYRIDINIUM DERIVATIVES IN RELATION TO *ESCHERICHIA COLI*

© 2019 N. M. Shlepotina<sup>1\*</sup>, O. L. Kolesnikov<sup>1</sup>, Yu. S. Shishkova<sup>1</sup>,  
I. V. Galagudin<sup>1</sup>, E. V. Kalita<sup>2</sup>, A. R. Tkachyova<sup>2</sup>, D. G. Kim<sup>2</sup>

\*E-mail: grant0408@yandex.ru

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «South-Urals State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

<sup>2</sup>South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russia

Received: 22.05.2019. Accepted: 25.06.2019

At present, the resistance to antibacterial substances being formed in microorganisms opens up new areas of search for alternative compounds with similar properties. In scientific research in recent years, the antimicrobial properties of platinum compounds and pyridinium derivatives have been actively studied. The purpose of this study was to study effect against *Escherichia coli* of aqueous solutions of 1-allyl-2-aminopyridinium bromide and two hexachloroplatinate complexes in three experiments. As a result of the carried out research, a reliable antibacterial effect of one of the platinum compounds was revealed in relation to *Escherichia coli*.

**Key words:** antimicrobial agents, *Escherichia coli*, platinum compounds, pyridinium derivatives

**Authors:**

**Shlepotina N. M.**, ✉ Lecturer of the Department of Biology of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «South-Urals State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

Chelyabinsk, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «South-Urals State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Department of Biology. Phone: +79507477232, **E-mail:** grant0408@yandex.ru;

**Kolesnikov O. L.**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Biology of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «South-Urals State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

**Shishkova Y. S.**, Doctor of Medical Sciences, Docent, Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «South-Urals State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

**Galagudin I. V.**, Senior Laboratory Assistant of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «South-Urals State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

**Kalita E. V.**, Engineer, Research Assistant of the Department of Theoretical and Applied Chemistry of Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «South Ural State University» (National Research University), Chelyabinsk, Russia;

**Tkachyova A. R.**, Graduate Student of the Department of Theoretical and Applied Chemistry of Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «South Ural State University» (National Research University), Chelyabinsk, Russia;

**Kim D. G.**, Doctor of Chemical Sciences, Professor, Professor of the Department of Theoretical and Applied Chemistry of Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «South Ural State University» (National Research University), Chelyabinsk, Russia.

## Авторский указатель

<b>А</b>			
Абрамов К. С.	1085	Зурочка В. А.	1163, 1168
Абрамовских К. А.	1249	Зырянова К. С.	1113
Абрамовских О. С.	1249	<b>И</b>	
Аликина И. Н.	1089	Иванова Р. А.	1113
Арташян О. С.	1298	Ильвес А. Г.	1184
Артюхевич Т. В.	1211	Ильченко А. В.	1184
Асадуллина Т. С.	1099	Исаева Е. Н.	1173
<b>Б</b>		<b>К</b>	
Бакеева А. Е.	1235	Казакова О. А.	1125
Батурина И. Л.	1254	Калита Е. В.	1313
Бедулева Л. В.	1269	Калмантаева О. В.	1177, 1274
Белоусова А. В.	1103	Калугина А. П.	1293
Белошангин А. С.	1201	Кантюков С. А.	1140
Бойко М. С.	1235, 1280	Карцева А. С.	1177, 1274
Бочкова М. С.	1157, 1293	Ким Д. Г.	1313
Бриллиант С. А.	1134	Клюева Ю. Н.	1134
Бурмистрова А. Л.	1289	Княжева М. А.	1217, 1263
Бурова Л. А.	1224	Колесников О. Л.	1313
<b>В</b>		Колупаева И. Л.	1192
Виноградов А. В.	1093	Колупаев В. А.	1192
Власова Е. В.	1239	Коренчук Ю. В.	1269
<b>Г</b>		Коркмазов А. М.	1201
Галагудин И. В.	1313	Корнова Н. В.	1113, 1201
Галимова Э. Ф.	1099	Костоломова Е. Г.	1206
Галимов Ш. Н.	1099	Криволапова И. М.	1244
Гафарова Р. К.	1298	Кривцов А. В.	1125, 1129
Гейн С. В.	1308	Кробинец И. И.	1184
Гетте И. Ф.	1103, 1134	Кудрявцев И. В.	1184
Гизингер О. А.	1108, 1113	Кузьмина Е. В.	1211
Гольдина И. А.	1118	<b>Л</b>	
Гренадерова М. А.	1258	Лакницкая А. О.	1108
Гриценко В. А.	1163, 1168	Латюшина Л. С.	1211
Гусельников М. А.	1129, 1304	Литвинова Л. С.	1157
<b>Д</b>		Лифанов Н. А.	1192
Давыдова Е. В.	1085	<b>М</b>	
Данилова И. Г.	1103, 1134	Мазунина А. А.	1129
Дерябина С. С.	1239	Малашичева А. Б.	1224
Добрынина М. А.	1163, 1168	Мальшева Л. Ю.	1211
Долгих О. В.	1125, 1129	Маммедова Дж. Т.	1224
<b>Е</b>		Маркова Е. В.	1118, 1217
Емельянов В. В.	1103, 1134	Мельников И. Ю.	1192
Емельянов И. В.	1232	Меньшиков И. В.	1269
Ермолаева Е. Н.	1140	Миронова Р. И.	1177
<b>З</b>		Муртазина А. З.	1099
Забокрицкий Н. А.	1145, 1150	Мякишева Э. Н.	1249
Заморина С. А.	1157	<b>Н</b>	
Заморина С. А.	1293	Назарова В. Е.	1113
Зиганшин О. Р.	1108	Никонова С. Е.	1232
Зурочка А. В.	1163, 1168	Никушкина К. В.	1232, 1254
		Новожеева Т. П.	1217
		Новоселова О. М.	1184

## Авторский указатель

<b>О</b>		Сташкевич Д. С.	1289
Орловская И. А.	1118	Суходвей Ю. Г.	1206
Осиков М. В.	1085, 1235	<b>Т</b>	
Отавина Е. А.	1284	Терентьев А. С.	1269
<b>П</b>		Тимганова В. П.	1157, 1293
Павлов В. М.	1177	Ткачёва А. Р.	1313
Партылова Е. А.	1093	Тодосенко Н. М.	1157
Пашнина И. А.	1239, 1244	Топоркова Л. Б.	1118
Петухова В. И.	1140	Травников О. Ю.	1099
Пигарева Н. В.	1173	Тюменцева Н. В.	1298
Пиотрович А. В.	1211	<b>У</b>	
Прахова Л. Н.	1184	Унгер И. Г.	1206
<b>Р</b>		<b>Ф</b>	
Раев М. Б.	1157, 1293	Файзуллина А. И.	1163, 1168
Резайкин А. В.	1093	Фирстова В. В.	1177, 1274
Рогозин М. М.	1274	Фомина Л. О.	1163, 1168
Рубаник К. С.	1184	Фрейдлин И. С.	1224
Рябова Л. В.	1232, 1254	<b>Х</b>	
<b>С</b>		Хайбуллина З. Г.	1099
Савкин И. В.	1217	Храмова Т. В.	1269
Савочкина А. Ю.	1249	Храмцова Ю. С.	1298
Савчук К. С.	1254	Храмцов П. В.	1157, 1293
Сазонов С. В.	1093	<b>Ц</b>	
Санюкович А. А.	1201	Цейтлер Т. А.	1103, 1134
Саркисян Н. Г.	1258	<b>Ч</b>	
Сашенков С. Л.	1140, 1192	Челакова Ю. А.	1304
Семёнова Д. С.	1224	Черешнев В. А.	1157
Сергеев А. Г.	1093	Чумаков Н. С.	1258
Серебрякова М. К.	1184	<b>Ш</b>	
Серенко Е. В.	1263	Шаравьева И. Л.	1308
Сидорова Л. П.	1103, 1134	Шардина К. Ю.	1157
Сидоров А. Ю.	1269	Шемякин И. Г.	1177, 1274
Силкина М. В.	1177, 1274	Шишкова Ю. С.	1313
Симбирцев А. С.	1173	Шлепотина Н. М.	1313
Симонян Е. В.	1235, 1280	Шушпанова Т. В.	1217
Синева С. А.	1173	<b>Я</b>	
Солтыс А. М.	1201	Яковлева В. П.	1140
Старикова Э. А.	1224		
Старкова К. Г.	1284		